









Aus dem Institut für Tierphysiologie  
der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. mult. J. Brüggemann  
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

---

**Untersuchungen an Schafen über Adaptationsvorgänge  
insbesondere die Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase  
im Pansen bei Verabreichung von Stärke**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Ragnar Geiges  
aus Freiburg/Breisgau

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen  
Fakultät der Universität München

Dekan : Prof. Dr. E. Dahme

Referent : Prof. Dr. D. Giesecke

Korreferent : Prof. Dr. H. Karg

Tag der Promotion : 22. 2. 1974



## INHALTSVERZEICHNIS

|       |                                                                                                   | Seite |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.    | EINLEITUNG UND<br>PROBLEMSTELLUNG                                                                 | 1     |
| 1.1   | Über die Beteiligung des Magens und des<br>Darmtraktes von Wiederkäuern an der<br>Stärkeverdauung | 2     |
| 1.2   | Mikrobieller Abbau von Stärke im Vormagen                                                         | 5     |
| 1.3   | Problemstellung                                                                                   | 11    |
| 2.    | MATERIAL UND METHODEN                                                                             | 12    |
| 2.1   | Versuchstiere, Haltung und Fütterung                                                              | 12    |
| 2.2   | Versuche in vivo                                                                                  | 12    |
| 2.2.1 | Überfütterungsversuch mit Mais                                                                    | 12    |
| 2.2.2 | Adaptationsversuch                                                                                | 14    |
| 2.3   | Entnahme und Behandlung der Proben                                                                | 14    |
| 2.4   | Versuche in vitro                                                                                 | 15    |
| 2.4.1 | Fermentor                                                                                         | 15    |
| 2.4.2 | Messung der Fermentationsrate                                                                     | 15    |
| 2.5   | Biochemisch-analytische Methoden                                                                  | 17    |
| 2.5.1 | Bestimmung der Stärkeverdauung in vitro                                                           | 17    |
| 2.5.2 | Messung der Amylaseaktivität                                                                      | 18    |
| 2.5.3 | Extraktion und Bestimmung von Desoxy-<br>ribonucleinsäure (DNS)                                   | 19    |
| 2.5.4 | Bestimmung von $\text{NH}_3\text{-N}$                                                             | 19    |
| 2.5.5 | pH-Messung                                                                                        | 19    |
| 2.6   | Statistische Methoden                                                                             | 20    |

|                                                                                                        | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. E R G E B N I S S E                                                                                 | 21    |
| 3.1 Beziehungen zwischen Energie- und Stickstoffquellen in vitro                                       | 21    |
| 3.1.1 Einfluß von Maltose auf den $\text{NH}_3$ -Spiegel                                               | 21    |
| 3.1.2 Einfluß von $\text{NH}_3$ -Gaben auf die Kohlenhydratvergärung                                   | 25    |
| 3.1.3 Fermentation von Stärke verschiedener Löslichkeit in vitro                                       | 27    |
| 3.2 Adaptationsvorgänge im Pansen bei Stärkefütterung                                                  | 36    |
| 3.2.1 Stoffwechselfvorgänge im Pansen bei hohen Stärkegaben - Überfütterungsversuch mit Mais           | 36    |
| 3.2.1.1 Fermentation und Acidität                                                                      | 36    |
| 3.2.1.2 Mikrobielles Wachstum und Stärkeverdaunung in vitro                                            | 42    |
| 3.2.2 Die Aktivität der freien $\alpha$ -Amylase des Pansens in vivo und in vitro                      | 44    |
| 3.2.3 Amylaseaktivität und Acidität im Pansen bei steigenden Stärkegaben - Adaptationsversuch in vitro | 51    |
| 4. D I S K U S S I O N                                                                                 | 62    |
| 4.1 Zusammenhänge zwischen Kohlenhydrat- und N-Stoffwechsel im Pansen                                  | 62    |
| 4.2 Zur Bedeutung der freien $\alpha$ -Amylase für die Adaptation an Stärke                            | 64    |
| 5. Z U S A M M E N F A S S U N G<br>S U M M A R Y                                                      | 67    |
| 6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S                                                             | 71    |

## 1. EINLEITUNG UND PROBLEM- STELLUNG

Die Wiederkäuer sind durch die Ausbildung ihres Vormagensystems hauptsächlich zur Verdauung von rohfaserreichem Pflanzenmaterial geeignet. Aus verschiedenen Gründen kann es sich als vorteilhaft erweisen, einen wesentlichen Teil der Energieträger in Form von leicht verdaulichen Kohlenhydraten zu verabreichen. Anders als bei der Milchproduktion sind bei der Mast Rationen mit 80 % und mehr Getreide aus zahlreichen Versuchen bekannt geworden (CRICHTON u. PRESTON, 1963; CATALANO u. RUSSO, 1967; HOFMANN, 1971).

Die Verabreichung solcher Rationen entspricht jedoch nicht den verdauungsphysiologischen Verhältnissen der Wiederkäuer. Über verschiedene Störungen, die bei stärkerer Fütterung auftreten können, ist berichtet worden. Dabei spielen die Adaptation selbst, die Futterverweigerung ("off feed"), die subakute und latente Acidose und schließlich auch die akute Form der Pansenacidose eine Rolle (DIRKSEN, 1973). Damit treten die Stärkeverdauung und solche biochemischen Prozesse, die an der Anpassung der Pansenflora an stärkereiches Futter beteiligt sind, in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses.

Bevor auf die experimentellen Fragen dieser Problematik eingegangen wird, sollen die Beteiligung verschiedener Verdauungsräume des Wiederkäuers an der Umsetzung von Stärke und die mikrobiologischen und biochemischen Aspekte der Stärkeverdauung im Vormagen anhand der Fachliteratur erörtert werden.

### 1.1 Über die Beteiligung des Magens und des Darmtraktes von Wiederkäuern an der Stärkeverdauung

Wie das Rauhfutter gelangen auch stärkehaltige Futtermittel in der Regel mehr oder minder zerkleinert zunächst in den Pansen, wo sie zu flüchtigen Fettsäuren und Gasen abgebaut werden.

Stärkekörner sind in ihrem Bau nicht homogen, sondern bestehen aus zwei räumlich voneinander getrennten Fraktionen, dem Amylopektin als Hüllsubstanz (ca. 80 %) und der Amylose, die im Innern des Stärkekorns liegt (MANGOLD, 1929). Es handelt sich um Polysaccharide die aus Glucoseresten zusammengesetzt sind  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Die Grundbausteine der Amylose sind Maltoseeinheiten ( $\alpha$ -Glucosido-4-glucose), die ihrerseits  $\alpha$ -1,4-glucosidisch verbunden sind. Beim Amylopektin, das ebenfalls aus  $\alpha$ -glucosidisch verbundenen Glucoseresten aufgebaut ist, liegen neben 1,4-Bindungen auch 1,6-Bindungen vor, da nach enzymatischer Spaltung neben Maltose auch Isomaltose gefunden wird, so daß hier die Polysaccharidketten verzweigt sind (KARLSON, 1972).

Der Abbau dieser polymeren Kohlenhydrate im Vormagen der Wiederkäuer ist weitgehend. Wie Fütterungsversuche an Schafen (Tabelle 1) ergaben, wird der größte Teil der aufgenommenen Stärke im Pansen verdaut.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten KARR et al. (1966) bei Versuchen an Ochsen. Nach Verabreichung von 19 bis 63.5 % Stärke im Futter gelangten bei steigender Konzentration 16 bis 38 % in den Labmagen. Bei Stärkefütterung ad libitum entgehen bis zu 55 % Stärke der Pansenverdauung (WRIGHT et al., 1966).

Da je nach Verdaulichkeit 6 - 10 % der Bruttoenergie des aufgenommenen Futters als Methan sowie 3 % als Wärme verloren gehen (CLAPPERTON u. BLAXTER, 1965), mag der Abbau von

Stärke im Pansen unwirtschaftlich erscheinen. So muß zwangsläufig die Frage auftauchen, welche Möglichkeiten bestehen, die gefütterte Stärke der Pansenverdauung zu entziehen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, läßt sich der prozentuale Anteil der Stärke, die den Dünndarm erreicht, durch den Anteil im Futter beeinflussen. Dies gilt auch für die Art und Beschaffenheit der gefütterten Stärke, wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 1

Organ und Ausmaß der Stärkeverdauung bei Schafen in Abhängigkeit von der verabreichten Stärkemenge  
(nach TUCKER et al., 1968)

| Futterkomponenten in % |     | aufgenommene Stärke<br>(g/24 h) | Verdauung der Stärke in % |      |
|------------------------|-----|---------------------------------|---------------------------|------|
| Mais                   | Heu |                                 | Magen <sup>+</sup>        | Darm |
| 20                     | 76  | 172                             | 84.2                      | 15.8 |
| 40                     | 53  | 326                             | 72.8                      | 27.2 |
| 60                     | 31  | 460                             | 71.2                      | 28.8 |
| 80                     | 7.5 | 576                             | 76.4                      | 23.6 |

<sup>+</sup>) einschließlich Vormagen

Tabelle 2

Organ und Ausmaß der Stärkeverdauung bei Schafen in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der verabreichten Stärke (nach ARMSTRONG u. BEEVER, 1969)

| Stärkequalität        | Verdauung der Stärke in % |          |          |
|-----------------------|---------------------------|----------|----------|
|                       | Magen                     | Dünndarm | Dickdarm |
| Weizen o. Maisflocken | 91.8±0.8                  | 8.0±0.8  | 0.2±0.09 |
| gebrochener Mais      | 68.0±1.8                  | 26.0±2.2 | 5.3±2.10 |

Obgleich der mikrobiellen Verdauung im Vormagen somit der relativ größte Anteil des Stärkeumsatzes zufällt, können doch recht beachtenswerte absolute Mengen Stärke in den Labmagen und Dünndarm übertreten. Darum erscheint es angebracht, den physiologischen Wert einer Umgehung der Stärkeverdauung im Vormagen zu erörtern.

Durch den niedrigen pH-Wert im Labmagen - er liegt beim Schaf zwischen pH 1 und 1.3, beim Rind zwischen pH 2 und 4.1 (BERGNER u. KETZ, 1969) - kommt es hier zu einer Hemmung des gesamten Kohlenhydratabbaues (HEALD, 1951; WELLER u. GRAY, 1954).

Im Dünndarm, vorwiegend im Duodenum, wird die Stärke durch die Pankreasfermente Amylase und Maltase zu Glucose hydrolysiert (SIDONS, 1968; ARMSTRONG u. BEEVER, 1969). Mit zunehmendem Stärkegehalt im Dünndarm nimmt auch die Intensität der Verdauung zu (TUCKER et al., 1968). CLARY et al. (1967) konnten bei einer Erhöhung des Anteils von Stärke von 20 auf 80 % im Dünndarm von Schafen eine vermehrte Ausschüttung von Pankreassaft (von 71 ml/24 h auf 340 ml/24 h) und eine höhere Amylaseaktivität nachweisen. Aus Mucosahomogenaten von Duodenum, Jejunum und Ileum isolierten SIDONS (1968) und HEMBRY et al. (1967) Amylase und Maltase. Die Bakterienflora des Dünndarms hat hingegen keinen nennenswerten Anteil an der Verdauung. Bisherige Arbeiten (LARSEN et al., 1966; WRIGHT et al., 1966; WELLER u. GRAY, 1954) lassen den Schluß zu, daß Stärke nach Hydrolyse im Dünndarm als Glucose resorbiert wird. Wie ØRSKOV et al. (1970) berichten, entgehen bei Fütterungsversuchen mit hohem Anteil an gebrochenem Mais bei Schafen beträchtliche Stärkemengen der Pansenverdauung. Allerdings wird auch im Dünndarm nur ein geringer Teil hydrolysiert und als Glucose resorbiert, weil die Verdauungskapazität begrenzt ist. Auch der aktive Transport von Glucose durch die Dünndarmwand der Wiederkäuer scheint an-

ders zu verlaufen als bei Monogastriern. So haben Versuche von SCHARRER et al. (1972,1973) gezeigt, daß die Mechanismen des aktiven Glucosetransportes sehr wenig ausgebildet sind. Trotzdem kann bei ausreichendem Konzentrationsgradienten Glucose auch durch Diffusion resorbiert werden.

Wenn lösliche Kohlenhydrate der Dünndarmverdauung entgehen, müssen sie in beträchtlichen Mengen in den Dickdarm gelangen. Die Verhältnisse im Dickdarm sind denen des Pansens ähnlich, sowohl was die Bakterienflora als auch ihre Aktivität betrifft (BRÜGGEMANN u. GIESECKE, 1963). Als Endprodukte des Kohlenhydratabbaues entstehen hier ebenfalls flüchtige Fettsäuren und Gase. ØRSKOV et al. (1970) kamen nach Versuchen über die Stärkeverdauung zu folgendem Schluß: Stärke wird auch im Dickdarm schlecht genutzt, da die Resorption der flüchtigen Fettsäuren im Dickdarm mangelhaft ist (steigender Gehalt im Kot) und das gebildete Bakterienprotein der Verdauung entgeht.

Da Stärke im Dünndarm und Dickdarm von Wiederkäuern schlecht genutzt wird, dürfte die mikrobielle Verdauung im Vormagen trotz gewisser Nachteile gegenüber einer monogastrischen Verdauung besonderes Interesse verdienen.

## 1.2 Mikrobieller Abbau von Stärke im Vormagen

Der Pansen bietet neben seinen mechanischen Eigenschaften, wie Durchfeuchtung, Durchmischung und Transport der Nahrung, einen optimalen Lebensraum für die Verdauungssymbionten, die Mikroorganismen, die in ihrer Gesamtheit als selbständiges Gewebe anzusprechen sind. Zahl und Artenreichtum der Mikroorganismen sind von der Ernährung des Wirtstieres abhängig und insofern erheblichen Schwankungen unterworfen. Bei mikroskopischer Zählung werden etwa

5 - 50 x 10<sup>9</sup> Bakterien (GIESECKE, 1973) pro g Panseninhalt gefunden. Die Konzentration der Protozoen schwankt zwischen wenigen 1000 und 25 Millionen pro g Panseninhalt (HARMEYER, 1973).

Am Abbau der Stärke im Pansen sind sowohl Bakterien wie Protozoen beteiligt. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten stärkeabbauenden Bakterienarten.

Tabelle 3

Die wichtigsten stärkeabbauenden Bakterienarten  
(nach HUNGATE, 1966)

| Bakterienart                | Substrate |          |         |         |
|-----------------------------|-----------|----------|---------|---------|
|                             | Stärke    | Dextrine | Maltose | Glucose |
| Bacteroides amylophilus     | +         |          | +       | -       |
| Bacteroides ruminicola      | +         | ±        | ±       | +       |
| Clostridium lochheadii      | +         |          | +       | +       |
| Succinimonas amylolytica    | +         | +        | +       | +       |
| Streptococcus bovis         | +         |          | +       | +       |
| Lactobacillus bifidus       | +         |          | +       | +       |
| Butyrivibrio alactacidigens | +         | ±        | +       | +       |

± = die meisten Stämme +

Bei den stärkeabbauenden Protozoen spielen nur Ciliaten, die in Tabelle 4 aufgeführt sind, eine entscheidende Rolle.

Tabelle 4

Übersicht über Stoffwechselaktivitäten verschiedener Ciliatenspecies aus dem Vormagen der Wiederkäuer (nach HARMEYER, 1973)

| Protozoenart                  | Substrate, die abgebaut oder inkorporiert werden |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| Isotricha                     | Mais- und Reisstärke, Glucose                    |
| Dasytricha                    | Mais- und Reisstärke, Maltose, Glucose           |
| ruminantium                   | (Reisstärke nicht von lebenden Zellen)           |
| Entodiniumarten               | Amylose, Amylopektin, Maltose                    |
| Eudiplodinium neglectum       | Stärke, Maltose                                  |
| Eudiplodinium maggii          | Stärkekörner, Reis- und Kartoffelstärke          |
| Polyplastron multivesiculatum | Reis, Kartoffelstärke, Maltose                   |
| Epidiniumarten                | kleine Stärkekörner, Maltose, Glucose            |

Bei Bakterien wie auch bei Protozoen finden wir als stärkehydrolysierende Enzyme  $\alpha$ -Amylasen, die in den Zellen lokalisiert sind, oder nach außen abgegeben werden. NASR (1950)

konnte erstmals bemerkenswerte Aktivitäten der  $\alpha$ -Amylase nachweisen. Zwei Jahre später gelang es HOBSON u. MACPHERSON (1952) ein stärkeabbauendes Enzym, das mit der  $\alpha$ -Amylase des Pankreas identisch war, aus zellfreien Filtraten von Bakterienkulturen (*Streptococcus bovis*) des Pansens zu isolieren. Die Verdauung von löslicher und granulierter Stärke wiesen WALKER u. HOPE (1964) in zellfreien Filtraten sowie mit gewaschenen Zellsuspensionen (*Clostridium butyricum* und *Streptococcus bovis*) nach, die mit Ultraschall behandelt waren. Auch aus *Iso-tricha* und *Dasytricha*arten konnte nach Zellzertrümmerung  $\alpha$ -Amylase isoliert werden. Die Protozoen besitzen gegenüber den Bakterien im Wettstreit um die Stärke den Vorteil, daß sie in sehr kurzer Zeit große Mengen intakter Granula aufnehmen können.

Die enzymatische Spaltung der Stärke durch die  $\alpha$ -Amylase setzt in der Mitte des Makromoleküls an, so daß zunächst Dextrine, dann Oligosaccharide und bei längerem Einwirken des Enzyms Maltoseeinheiten entstehen. Meist in Gesellschaft mit den  $\alpha$ -Amylasen treten Maltasen auf, welche die Maltosebruchstücke in Glucoseeinheiten aufspalten. Glucose selbst ist im Pansen außer bei sehr intensivem Stärkeabbau (RYAN, 1964) nicht nachweisbar, da sie sehr rasch umgesetzt wird (LARSON, 1963). Zum Teil wird sie in Form von Bakterienstärke gespeichert und der Darmverdauung zugeführt. Der weitaus größte Teil jedoch unterliegt der anaeroben Vergärung und wird zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  und flüchtigen Fettsäuren abgebaut. Die Gase werden teils zu Methan umgesetzt und ausgeschieden, während die flüchtigen Fettsäuren, namentlich Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure laufend aus dem Pansen zur Resorption gelangen.

Bei der Fütterung von leicht verdaulichen Kohlenhydraten erhöht sich gegenüber den viel schwerer angreifbaren

Zellwandbestandteilen neben der vermehrten Bildung von flüchtigen Fettsäuren auch das Angebot an Kohlenstoffgerüsten und Energie für die Aminosäuren- und Proteinsynthese der Mikroorganismen. Zur Synthese benötigter  $\text{NH}_3$ -N entsteht beim Abbau von Proteinen und nichtproteinartigen Stickstoffquellen. Der Ammoniakgehalt im Pansen ist von der Natur des Nahrungsstickstoffs und der im Pansen umgesetzten Menge und Art der Energiequellen abhängig. Die Proteinsynthese wird einerseits vom Gehalt des nicht resorbierten Ammoniaks, andererseits von den Kohlenstoffgerüsten, bedingt durch das Nahrungsangebot, bestimmt. CHRISTIAN u. WILLIAMS (1966) stellten bei vergleichenden Versuchen mit Schafen, die Heu- bzw. Stärkerationen erhielten, bei letzteren einen wesentlich geringeren Anstieg des Ammoniakgehaltes im Pansen nach Fütterung fest, was mit einer früher einsetzenden Proteinsynthese durch ein rascheres Angebot an Kohlenstoffskeletten zu erklären ist. In Versuchen in vitro und in vivo konnten EL-SHAZLY et al. (1961) durch Stärkezugabe eine Hemmung der Celluloseverdauung nachweisen, die durch eine Konkurrenz um essentielle Nährstoffe, namentlich Stickstoffverbindungen, zwischen cellulolytischen und amylolytischen Bakteriengruppen erklärt wurde. Diese Hemmung konnte durch Beifütterung von Harnstoff aufgehoben werden. Geringe Glucose- und Stärkemengen hingegen vermögen aus nicht ganz geklärten Gründen die Celluloseverdauung zu stimulieren (JOHNSON, 1963).

Die Steigerung der Proteinsynthese führt zu einer Vermehrung der mikrobiellen Zellmasse. Quantitative Veränderungen der Gesamtkeimzahl in Abhängigkeit von Futterationen ergaben Versuche von ORTH u. KAUFMANN (1961), die in Tabelle 5 zusammengefaßt sind. Auch Veränderungen der Zusammensetzung der Bakterienflora sind bekannt, spielen in diesem Zusammenhang jedoch keine Rolle.

Tabelle 5

Keimgehalt im Pansen in Abhängigkeit  
von Futterrationen

| verabreichtes Futter  | Keimgehalt / ml Pansensaft |
|-----------------------|----------------------------|
| Stroh                 | $0.4 - 1.5 \times 10^{10}$ |
| Heu                   | $0.9 - 1.5 \times 10^{10}$ |
| stärkehaltiges Futter | $- 6.0 \times 10^{10}$     |

Die vermehrte Fütterung leicht verdaulicher Kohlenhydrate führt ferner durch die intensivere Bildung von flüchtigen Fettsäuren sowie Milchsäure zu einem Absinken des pH-Wertes im Pansen, was eine Hemmung des Protozoenwachstums sowie der Amylaseaktivität, deren pH-Optimum bei 6.9 liegt, zur Folge haben kann.

### 1.3 PROBLEMSTELLUNG

Wie aus der Literaturbetrachtung hervorgeht, haben sich bisherige Studien über die Stärkeverdauung bei Wiederkäuern vor allem mit der Passage und dem Ausmaß des Stärkeabbaues in verschiedenen Teilen des Verdauungstraktes sowie mit Veränderungen der Pansenflora und -fauna bei Fütterung stärkereicher Rationen auseinandergesetzt. Ziel der eigenen Experimentalarbeit war es, anhand biochemischer Kriterien Prozesse der Adaptation des Vormagenstoffwechsels an Stärke zu untersuchen. Außer Messungen an Schafen mit Pansenkanülen bei spontaner Verabreichung hoher Stärkeregaben (Überfütterungsversuch) und bei langsamer Anpassung (Adaptationsversuch) wurden auch Untersuchungen an der Pansenflora *in vitro* durchgeführt, um bestimmte Teilreaktionen zu verfolgen, die *in vivo* schwer oder gar nicht zugänglich sind.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand einmal die Frage nach der wechselseitigen Beeinflussung von Gärungs- und Stickstoff-Stoffwechsel. Als Kriterien wurden dabei die Fermentationsrate *in vitro*, die Acidität und die Stärkeverdauung *in vitro* sowie die Konzentration an DNS und  $\text{NH}_3$ -N herangezogen, um die Beziehung zwischen Energie und N-Quellen *in vitro* zu prüfen und die Veränderungen im Pansen bei Überfütterung mit Stärke zu charakterisieren. Zum anderen war die Frage von Bedeutung, welche Rolle der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen bei der Anpassung der Pansenflora an Stärke zukommt und inwieweit die Aktivität dieses Enzyms zur Kennzeichnung des Adaptationsprozesses herangezogen werden kann.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Als Versuchstiere standen fünf erwachsene kastrierte männliche Schafe (M, K, Q, R, S) der Merinolandrassse zur Verfügung. Sie wogen zwischen 60 und 90 kg und waren mit Pansenfisteln und Gummikanülen nach JARRETT (1948) versehen. Sie wurden in Einzelboxen mit ca. 3 m<sup>2</sup> Lauffläche und Stroheinstreu gehalten.

Den Versuchstieren wurde mit Ausnahme des Überfütterungs- bzw. Adaptationsversuches Heu ad libitum gereicht. Daneben hatten sie freien Zugang zu Trinkwasser und Salzlecksteinen. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich um 8.00 und um 16.00 Uhr, bei den Versuchen in vitro wurde, um möglichst ausgeglichene Versuchsbedingungen herzustellen, am Vorabend zwei Stunden nach Fütterung das nicht verzehrte Heu entzogen.

Heuanalysen während der Versuche ergaben einen Gehalt von 8 - 12.8 % Rohprotein und 26.6 - 29.9 % Rohfaser in der Trockenmasse.

### 2.2 Versuche in vivo

#### 2.2.1 Überfütterungsversuch mit Mais

In diesem Versuch standen die Tiere M, K, Q und R über den Zeitraum von 4 Wochen. In der 1. Versuchswoche erhielten die Versuchstiere 1600 g Heu täglich. Die Verzehrermittlung erfolgte 1.5 h nach Fütterung. Tabelle 6 gibt Aufschluß über Zeitpunkt und Verwendungszweck der entnommenen Pansensaftproben.

Tabelle 6

Probenentnahmen beim Überfütterungsversuch

| Probenentnahme<br>nach Fütterung<br>(h) | Verwendungszweck<br>der Pansensaft-<br>proben | Versuchstag |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|----|----|----|----|----|----|
|                                         |                                               | 1.          | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. |
| 0, 4, 8                                 | pH-Messung                                    | x           | x  |    | x  |    | x  |    |
| 4                                       | NH <sub>3</sub> -N-Bestimmung                 | x           | x  |    | x  |    | x  |    |
| 4                                       | DNS-Bestimmung                                |             |    | x  |    |    |    | x  |
| 0                                       | Bestimmung des<br>Stärkeabbaues               |             |    |    | x  |    | x  |    |
| 4                                       | Messung der<br>Fermentationsrate              |             |    | x  | x  | x  |    |    |

In der zweiten Versuchswoche erhielten die Tiere zweimal täglich 200 g Heu sowie 600 g gebrochenen Mais. Bei Futterverweigerung wurde der Mais per fistulam in den Pansen gegeben. In dieser Woche erfolgte die Probenentnahme zur gleichen Zeit, jedoch täglich. In den beiden folgenden Wochen war die Fütterung prinzipiell mit der der zweiten Versuchswoche identisch, die Maisrationen mußten jedoch bisweilen wegen auftretender Pansenacidose reduziert werden. Die Probenentnahme erfolgte nur noch zweimal wöchentlich und zwar am 1. und 4. Tag der 3. Woche sowie am 1. und 7. Tag der 4. Woche.

Anschließend wurden die Tiere M und R wieder auf Heufütterung (1600 g/d) umgestellt, während die Tiere K und Q über weitere 4 Monate je 800 g Heu und 800 g gebrochenen Mais erhielten. So konnten mit dem Pansensaft beider Gruppen vergleichende Versuche in vitro angestellt werden.

### 2.2.2 Adaptationsversuch

Der Versuch erstreckte sich über den Zeitraum von 8 Wochen und wurde mit den Tieren K, Q, R und S durchgeführt. Sie bekamen während der ersten Versuchswoche 1600 g Heu pro Tag vorgelegt, ab der zweiten Versuchswoche zusätzlich steigende Mengen gebrochenen Mais, die nach der Stoffwechselgröße der einzelnen Tiere zugemessen waren. Die Fütterung erfolgte jeweils um 8.00 und 16.00 Uhr zu gleichen Teilen in Tagesmengen von 2 - 60 g/kg  $G^{3/4}$ /d. Die Heurationen wurden bis Ende des Versuches unverändert beibehalten.

Den Versuchstieren wurde bei Erreichen einer Grenzacidität im Pansen um pH 5 die Maiszulage entzogen, um eine möglichst physiologische De-Adaptation zu erzielen. Die Grenzacidität wurde bei den Tieren R und S nach der 5. bzw. 6. Versuchswoche erreicht, bei K und Q wurde nach der 7. Woche auf Heu umgestellt. Versuchstier S erhielt nach Futterverweigerung zu Beginn der 7. Woche 2 Tage Na-Bicarbonat (2 x täglich  $1/2$  l  $\text{NaHCO}_3$  4 % per fistulam).

### 2.3 Entnahme und Behandlung der Proben

Zur Entnahme von Pansensaft diente ein 60 cm langer halbstarrer Plastikschauch von 1.5 cm Innendurchmesser, an dessen Ende eine 250 ml Plastiksaugflasche angesetzt war. Fester Panseninhalt wurde nach gründlicher Durchmischung mit Hilfe eines Wundhakens entnommen.

Je nach Verwendungszweck wurde der Pansensaft bzw. Panseninhalt in  $\text{CO}_2$ -begaste Plastikflaschen oder Zentrifugengläser gegeben und in Dewargefäßen bei  $39.5^\circ\text{C}$  oder Eis - Kochsalzmischung rasch zur Weiterbehandlung in das Labor gebracht.

## 2.4 Versuche in vitro

### 2.4.1 Fermentor

Bei der verwendeten Apparatur, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist, handelte es sich um einen großlumigen Fermentor (ca. 1 l) mit Rührwerk nach dem Prinzip eines geschlossenen Systems, das auf eine Vereinfachung der Verhältnisse im Pansen abzielte. Hier konnte in großen Ansätzen der Abbau von Kohlenhydraten in vitro untersucht werden.

250 ml Panseninhalt wurden durch 2 Lagen Gaze grob filtriert, der Rückstand anschließend mit 200 ml Pufferlösung nach MC DOUGALL (1948) gemischt, das Gemisch 5 Minuten mit  $\text{CO}_2$  begast, 3 Minuten in einem Messerhomogenisator homogenisiert, erneut durch 2 Lagen Gaze gepreßt und beide Überstände nun zu 100 ml Puffer, der vorgewärmt und durch  $\text{CO}_2$ -Begasung auf pH 6.8 eingestellt worden war, in den Fermentor gegeben. Zur Gewinnung von  $\text{O}_2$ -freiem  $\text{CO}_2$  wurde eine Waschflasche mit Fiesers Lösung (DOETSCH et al., 1952) dazwischengeschaltet. Die Substratzugabe (Kohlenhydrate und Harnstoff) erfolgte nach einstündiger Laufzeit des Rührers, die Probenentnahme je nach Bedarf (in der Regel alle zwei Stunden) unter Ausschluß von Luftzutritt. Die Werte in Kapitel 3 beziehen sich auf Einzelversuche. Bei mehreren Ansätzen ist die Anzahl mit n bezeichnet und die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Streuungen angegeben.

### 2.4.2 Messung der Fermentationsrate

Bei allen Fermentorversuchen erfolgte halbstündlich die volumetrische Messung der Gasproduktion mittels einer Gasbürette. Bei 12stündigem Vorlauf des Fermentors wurde anstelle der Bürette eine Gummiblase zum Auffangen der Fer-

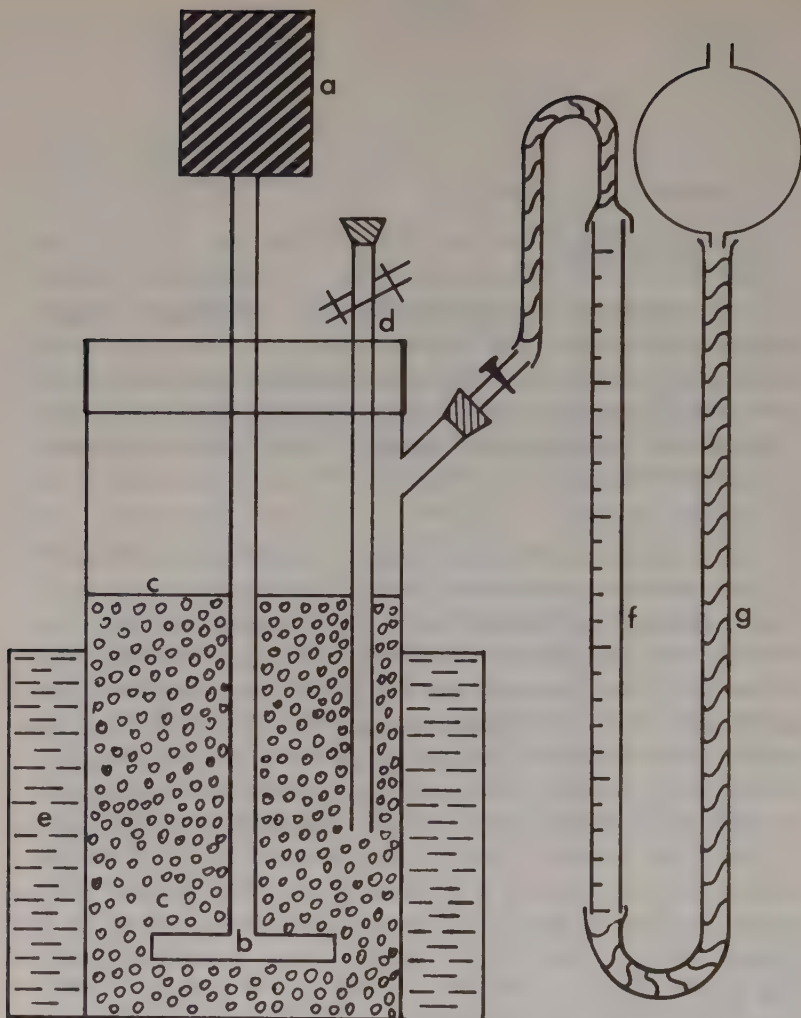


Abb. 1 Schematische Darstellung des für Inkubation der Pansenflora in vitro verwendeten Fermentors

- a) Elektromotor
- b) Rührer
- c) Pansensaft-Puffer-Gemisch
- d) Ansaugvorrichtung zur Probenentnahme
- e) Wasserbad
- f) Gasmeßröhre mit Sperrlösung
- g) Verbindungsschlauch zur Niveaueugel

mentationsgase angeschlossen und die über diesen Zeitraum gebildeten Gasvolumina in der Gasbürette zurückgemessen.

Zur Messung der Fermentationsraten während des Überfütterungsversuches wurden 50 g gut durchmischter Panseninhalt in mit Gasbüretten verbundenen Gärgefäßen aus Ganzglas mit 100 ml temperiertem,  $\text{CO}_2$ -begastem McDougall-Puffer bei  $39.5^\circ\text{C}$  inkubiert und die Gasproduktion volumetrisch in 15 - 20minütigen Intervallen abgelesen.

Die auf Normalbedingungen ( $0^\circ\text{C}$ , 760 mmHg) umgerechneten Gasvolumina sind als Gesamtproduktion (ml Gas / 6 bzw. 8 h) und Maximalraten (ml Gas / h im Bereich der maximalen Fermentation) angegeben oder der Fermentationsverlauf ist graphisch dargestellt.

## 2.5 Biochemisch-analytische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung der Stärkeverdauung in vitro

Grob filtrierter Pansensaft wurde mit McDougall-Puffer im Verhältnis 2 : 3 gemischt und davon jeweils 2 ml in Zentrifugengläser mit je 16 mg Stärke pipettiert. Zur Kontrolle der Auffindquote kamen zusätzlich 4 Ansätze mit 16 mg Maisstärke und 2 ml Puffer zur Bestimmung. Die Proben wurden 5 Minuten mit  $\text{CO}_2$  begast und anschließend mit Bunsenventilen verschlossen. Die Inkubationsdauer für je zwei Ansätze jedes Versuchstieres betrug 0, 12 und 24 h. Die Hydrolyse der Reststärke nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgte nach FRIEDEMANN et al. (1967). Die

dabei entstandene Glucose wurde nach der Glucose-Oxydase-Peroxydase-Methode (BERGMEYER u. BERNT, 1962) mit Reagenzien der Biochemica Testkombination (Boehringer) bestimmt und im Photometer Elko mit Filter S 45 E gemessen. Die Werte wurden mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt und auf Stärke umgerechnet.

Nach Bestimmung dieser Proben bzw. nach Beendigung des Überfütterungsversuches stellte sich heraus, daß es sich hierbei um keine sehr empfindliche Methode zur Bestimmung des Stärkeabbaues handelte, da die lange Inkubationszeit der Proben zu einer nicht erwünschten sekundären Adaptation der Mikroorganismen führte.

#### 2.5.2 Messung der Amylaseaktivität

Wie Vorversuche ergaben, ließ sich die Aktivität der intrazellulären als auch der extrazellulären  $\alpha$ -Amylase der Pansenflora in befriedigender Weise messen. Da der Abbau von Stärke jedoch außerhalb der Mikroorganismenzellen erfolgt, erschien es zweckmäßiger die Aktivität der extrazellulären  $\alpha$ -Amylase in der zellfreien Pansenflüssigkeit als Kriterium heranzuziehen. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei den Versuchen in vitro sowie beim Adaptationsversuch mit der enzymatischen Methode nach BERNFELD (1955), aber mit längeren Inkubationszeiten (10 bzw. 60 Minuten) und bei einer Temperatur von 39.5 °C.

Der Pansensaft wurde zunächst durch 2 Lagen Gaze grob filtriert, anschließend 20 Minuten bei 38 000 x g unter Kühlung auf 4 °C zentrifugiert. Nach Inkubation des Überstandes mit 1 %iger Stärkelösung wurde die gebildete scheinbare Maltose nach Farbreaktion mit Dinitrosalicylsäure-Reagenz im Photometer Eppendorf gemessen und die Werte

an einer mit Maltose erstellten Eichkurve abgelesen.

### 2.5.3 Extraktion und Bestimmung von Desoxyribonucleinsäure (DNS)

Die Bestimmung der DNS erfolgte als Maß für die mikrobielle Zellmasse. 2 ml grob filtrierter Pansensaft wurden zur Fällung der Proteine mit dem gleichen Volumen 0.5 N  $\text{HClO}_4$  gemischt, 30 Minuten im Eisbad gekühlt und bei 38 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden dem Bodensatz 4 ml 0.5 N  $\text{HClO}_4$  zugesetzt, verrieben und 30 Minuten im Wasserbad bei 70 °C hydrolysiert, anschließend 20 Minuten bei 38 000 x g zentrifugiert, der Überstand gesammelt und nach erneuter Extraktion beide Überstände vereinigt und mit 0.5 N  $\text{HClO}_4$  auf 10 ml aufgefüllt. Nach Farbreaktion mit Diphenylaminreagenz (BURTON, 1956) erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer Elko mit Filter S 59 E. Die DNS-Werte wurden an einer mit DNS aus Kalbsthymus (Boehringer) erstellten Eichkurve ermittelt.

### 2.5.4 Bestimmung von $\text{NH}_3$ -N

Zur Bestimmung von  $\text{NH}_3$ -N wurden 0.5 ml, bei höheren Konzentrationen 0.25 ml Pansensaft entnommen. Die Trennung erfolgte durch Mikrodifffusion nach CONWAY (1958), die Bestimmung mit Neßlers Reagenz. Gemessen wurde im Photometer Elko mit Filter S 42 E.

### 2.5.5 pH-Messung

Die Messung der pH-Werte im Pansen erfolgte nach Eichung des benutzten pH-Meters (Type pH 390 bzw. tragbares pH-Meter Type pH 39 N) mittels Einstabmeßkette unmittelbar nach Probenentnahme.

## 2.6 Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Einzelwerte und soweit möglich als Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Streuungen ( $\pm s$ ) wiedergegeben. Die Berechnung von Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten (Bravais) erfolgte nach OTTO (1958) unter Prüfung auf Zufallswahrscheinlichkeit mit dem abgeleiteten t-Test nach Fisher.

Die Berechnungen wurden mit dem Tischrechner Olivetti programma 101 durchgeführt.

### 3. E R G E B N I S S E

In den nachfolgenden Ergebnissen wird zunächst anhand von Versuchen an der Pansenflora *in vitro* über die wechselseitige Beeinflussung solcher Faktoren berichtet, die bei der Umstellung auf die Fermentation stärkereicher Rationen im Pansen eine besondere Rolle spielen. Erst danach werden die komplexeren Vorgänge im Pansen selbst bei Überfütterung mit Stärke und bei Adaptation an stärkereiche Fütterung behandelt.

#### 3.1 Beziehungen zwischen Energie- und Stickstoffquellen *in vitro*

Die hier aufgeführten Ergebnisse resultieren aus Versuchen mit dem Fermentor, der in Kapitel 2 im einzelnen beschrieben ist. Anhand der Konzentrationen von Ammoniakstickstoff ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) als N-Substrat und Desoxyribonucleinsäure (DNS) als Maß für die mikrobielle Zellmasse sowie der Fermentationsrate (FR) und des pH-Wertes sollen die Beziehungen zwischen Energie- und Stickstoff-Stoffwechsel bei kohlenhydratreicher Fütterung aufgezeigt werden.

##### 3.1.1 Einfluß von Maltose auf den $\text{NH}_3$ -Spiegel

Da Ammoniak als Stickstoffdonator für das mikrobielle Wachstum dient, wurde der Einfluß verschiedener Maltosekonzentrationen auf den  $\text{NH}_3$ -Spiegel untersucht und die Menge des Kohlenhydratangebots ermittelt, bei dem die natürliche  $\text{NH}_3$ -Quelle optimal genutzt werden kann. Als Kohlenhydrat interessierte zunächst die Maltose, das Endprodukt der Stärkehydrolyse.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, kam es zu Beginn der Fermentation zu einem geringgradigen Anstieg des  $\text{NH}_3$ -Stickstoffs, da in Abwesenheit von Substrat mehr freigesetzt

als fixiert wurde. Substratzugabe (Maltose) bewirkte eine Abnahme der  $\text{NH}_3$ -N-Konzentration bzw. förderte die mikrobielle Eiweißsynthese. Bei geringen Maltosegaben (1 u. 2 mg/ml) war die Abnahme von  $\text{NH}_3$ -N minimal, also das Kohlenhydratangebot zur Lieferung von Energie und Stoffwechselprodukten als Kohlenstoffskelette für die Proteinsynthese zu gering. Dagegen wurde bei höheren Maltosekonzentrationen (4 - 10 mg/ml) der Ammoniakstickstoff fast vollständig verbraucht. Das erhöhte Energieangebot und die Abnahme des Stickstoffs spiegelten sich in der Zunahme der DNS als Ausdruck des vermehrten mikrobiellen Wachstums wider.

Als Parameter für die Umsetzung der Maltose dienten Fermentationsrate und pH-Wert, die in Tabelle 8 wiedergegeben sind. Erwartungsgemäß stiegen mit zunehmender Maltosekonzentration die Maximalrate (maximal gebildete Gasmenge/h) und die Gesamtproduktion der Fermentationsgase an. Die pH-Werte nahmen nach anfänglicher geringer Zunahme (Ammoniakanstieg) in der Folge durch Bildung von Gärungssäuren ab. Bei niedrigen Maltosegaben (1 u. 2 mg/ml) bedeutete der pH-Anstieg nach 6stündiger Inkubation das Ende der Fermentation. Bei steigenden Maltosegaben zeigten die Werte nach 8 h abfallende Tendenz, bei einer Zugabe von 10 mg/ml sank der pH-Wert auf 5.71, was beim Wiederkäuer in vivo bereits als leichte Acidose anzusprechen ist.

Wie aus der Fermentationsrate sowie aus der nur geringfügigen Änderung der mikrobiellen Zellmasse und des  $\text{NH}_3$ -Stickstoffes zu ersehen war, konnte bei Konzentrationen von 1 u. 2 mg Maltose/ml zwar ein meßbarer Kohlenhydratumsatz erzielt werden, das Angebot an Kohlenstoffgerüsten reichte jedoch offenbar nicht aus, um eine deutlich meß-

Tabelle 7

Einfluß von Maltosegaben auf die Utilisation von  $\text{NH}_3$ -N und auf das mikrobielle Wachstum in vitro

| Maltosegaben<br>(mg/ml)               | Inkubationsdauer (h) |     |    |    |    |
|---------------------------------------|----------------------|-----|----|----|----|
|                                       | 0                    | 2   | 4  | 6  | 8  |
| $\text{NH}_3$ -N ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                      |     |    |    |    |
| 1                                     | 80                   | 80  | 81 | 81 | -- |
| 2                                     | 92                   | 105 | 96 | 93 | -- |
| 4                                     | 72                   | 77  | 68 | 35 | 13 |
| 6                                     | 67                   | 68  | 39 | 10 | 9  |
| 8                                     | 65                   | 67  | 46 | 9  | 7  |
| 10                                    | 71                   | 77  | 12 | 10 | 9  |
| DNS ( $\mu\text{g/ml}$ )              |                      |     |    |    |    |
| 1                                     | 23                   | 20  | 21 | 23 | -- |
| 2                                     | 24                   | 26  | 28 | 26 | -- |
| 4                                     | 25                   | 27  | 29 | 33 | 32 |
| 6                                     | 21                   | 22  | 26 | 28 | 30 |
| 8                                     | 21                   | 23  | 24 | 26 | 29 |
| 10                                    | 19                   | 22  | 25 | 30 | 32 |

Tabelle 8

Einfluß von Maltosegaben auf Fermentationsgrößen  
und pH-Werte in vitro

| Fermentations-<br>größen                                | Maltosegaben (mg/ml) |                  |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------|----------------------|------------------|------|------|------|------|
|                                                         | 1                    | 2                | 4    | 6    | 8    | 10   |
| Maximalrate<br>(ml Gas/h)                               | (55)                 | (53)             | 70   | 110  | 143  | 240  |
| Gesamtgaspro-<br>duktion<br>(ml/6 <sup>+</sup> bzw.8 h) | 196 <sup>+</sup>     | 183 <sup>+</sup> | 375  | 463  | 790  | 1130 |
| <hr/>                                                   |                      |                  |      |      |      |      |
| Inkubations-<br>dauer (h)                               | pH-Werte             |                  |      |      |      |      |
| 0                                                       | 7.10                 | 7.12             | 6.80 | 6.78 | 6.78 | 6.78 |
| 2                                                       | 6.90                 | 6.92             | 6.85 | 6.83 | 6.82 | 6.70 |
| 4                                                       | 6.87                 | 6.89             | 6.79 | 6.72 | 6.74 | 6.22 |
| 6                                                       | 6.91                 | 7.05             | 6.71 | 6.61 | 6.62 | 5.80 |
| 8                                                       | --                   | --               | 6.70 | 6.61 | 6.52 | 5.71 |

( ) kein sigmoider Kurvenverlauf

bare Zunahme der mikrobiellen Proteinsynthese zu ermöglichen. Bei höheren Konzentrationen von Maltose waren steigende Fermentationsraten sowie merkliche Zunahmen des mikrobiellen Wachstums zu verzeichnen. Während bei einer Maltosekonzentration von 4 mg/ml der  $\text{NH}_3$ -N im Fermentor nach 8 h weitgehend verbraucht war, wurden bei Maltosegaben von 6 mg/ml bereits nach 6 h und bei 10 mg/ml schon nach 4 h vergleichbare Werte erzielt. Da bei 10 mg/ml die Kapazität des Milieus bereits überschritten schien (Acidität), erwies sich eine Konzentration von 8 mg/ml am geeignetsten. Die weitgehende Ausnutzung des  $\text{NH}_3$ -Stickstoffes erforderte jedoch eine Substitution von Ammoniak.

### 3.1.2 Einfluß von $\text{NH}_3$ -Gaben auf die Kohlenhydratvergärung

In dieser Versuchsreihe wurde bei konstantem Kohlenhydratangebot der Einfluß von variierenden Stickstoffgaben geprüft. Neben Maltose wurde hier auch Glucose bei äquivalentem Angebot untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Die nach 8stündiger Inkubationszeit gemessene Konzentration von  $\text{NH}_3$ -N wies auf ein in allen Fällen ausreichendes Stickstoffangebot hin. Bei Zugabe von Maltose + Harnstoff im Verhältnis 1 : 0,2, dem höchsten Harnstoffangebot, deutete der Wert nach 8 h Inkubationszeit auf ein Überangebot von Stickstoff im Vergleich zur Energiequelle hin. Dieser Wert lag noch um 56 % über dem 2 h - Wert, also 1 Stunde nach Substratzugabe. Bei einem Maltose-Harnstoff-Verhältnis 1 : 0,1 war die  $\text{NH}_3$ -Stickstoffverwertung offenbar geringfügig höher als der parallel verlaufende Abbau von Harnstoff.

Die ausgeglichene Zunahme der DNS-Werte zeigte ein in allen Fällen ausreichendes Stickstoffangebot an mit maximalen

Tabelle 9

Einfluß verschiedener Harnstoff-N - Gaben auf den  $\text{NH}_3$ -N - Spiegel  
und das mikrobielle Wachstum in vitro

| Harnstoff-N<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Verhältnis Kohlen-<br>hydrat <sup>+</sup> : Harnstoff | n | Inkubationsdauer (h)       | $\text{NH}_3$ -N-<br>Änderung<br>2 - 8 h | DNS-Zunahme<br>( $\mu\text{g/ml}$ )<br>0 - 8 h |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|---|----------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                     |                                                       |   | 0 2 8                      |                                          |                                                |
|                                     |                                                       |   |                            | $\text{NH}_3$ -N ( $\mu\text{g/ml}$ )    |                                                |
| 187                                 | 1 : 0.05                                              | 1 | 67 200 106                 | -94                                      | 14                                             |
| 373                                 | 1 : 0.10                                              | 4 | 76 245 211<br>+14 + 8 + 15 | -34                                      | 16<br>+ 3                                      |
| 747                                 | 1 : 0.20                                              | 1 | 86 234 365                 | +131                                     | 13                                             |
| 409                                 | 1 : 0.10<br>(Glucose)                                 | 2 | 59 231 200<br>73 228 212   | -31<br>-16                               | 13<br>12                                       |

<sup>+</sup>) Konzentration Maltose bzw. Glucose (8 mg/ml)

Werten bei einem Kohlenhydrat-Harnstoff-Verhältnis von 1 : 0.1.

In Tabelle 10 sind die zugehörigen Fermentationsraten und pH-Werte wiedergegeben. Bei einem Verhältnis Maltose : Harnstoff von 1 : 0.05 fielen die Fermentationswerte unerwartet niedrig aus. Bei der höchsten Harnstoffzugabe (1 : 0.2) waren sie gegenüber 1 : 0.1 deutlich erniedrigt.

Während die pH-Werte bei den niedrigen Harnstoffkonzentrationen bereits nach 4 h abfielen, wurde dieser Schritt bei der Höchstkonzentration erst nach 6 h beobachtet und selbst nach 8 h war der pH-Wert noch über dem eingestellten Ausgangswert von 6.80.

Wie aus einem Vergleich der entsprechenden Werte aus den Tabellen 7 und 10 hervorgeht, bewirken bestimmte Harnstoffgaben eine erhöhte Fermentation sowie ein umfangreicheres mikrobielles Wachstum. Von den hier geprüften Dosierungen erwies sich eine Gabe von 0.1 g pro g Kohlenhydrat als optimal. Zwischen Maltose und Glucose traten in dieser Hinsicht keine Unterschiede auf. Bei einer Harnstoffzugabe von 0.2 g pro g Kohlenhydrat war ganz offensichtlich der  $\text{NH}_3$ -Grenzwert überschritten. Der  $\text{NH}_3$ -Gehalt selbst oder der daraus resultierende Anstieg des pH-Wertes in den alkalischen Bereich bewirkten offenbar eine Hemmung der Proteinsynthese (mikrobielles Wachstum) und / oder bestimmter Reaktionen bei der Kohlenhydratvergärung.

### 3.1.3 Fermentation von Stärke verschiedener Löslichkeit in vitro

Im folgenden wurde untersucht, inwieweit Unterschiede in der Fermentation zwischen einzelnen Stärkequalitäten bestehen und wie eine an stärkereiches Futter adaptierte Pansenflora die Fermentationsvorgänge verändert. Als Para-

Tabelle 10

Einfluß von verschiedenen Harnstoff-N-Gaben auf Fermentationsgrößen und pH-Werte in vitro

|                                                  |        |       |       |                    |
|--------------------------------------------------|--------|-------|-------|--------------------|
| Harnstoff-N ( $\mu\text{g/ml}$ )                 | 187    | 373   | 747   | 409                |
| Verhältnis Kohlenhydrat <sup>+</sup> : Harnstoff | 1:0.05 | 1:0.1 | 1:0.2 | 1:0.1 <sup>+</sup> |
| n                                                | 1      | 4     | 1     | 2                  |

|                              | Fermentationsgrößen |                 |     |              |
|------------------------------|---------------------|-----------------|-----|--------------|
| Maximalrate<br>(ml Gas/h)    | 83                  | 236<br>$\pm 21$ | 180 | 232<br>225   |
| Gesamtgasproduktion (ml/8 h) | 428                 | 993<br>$\pm 38$ | 742 | 1010<br>1061 |

| Inkubationsdauer<br>(h) | pH-Werte |                    |      |              |
|-------------------------|----------|--------------------|------|--------------|
| 0                       | 6.80     | 6.80               | 6.80 | 6.80<br>6.81 |
| 2                       | 6.88     | 6.97<br>$\pm 0.09$ | 6.98 | 6.98<br>6.99 |
| 4                       | 6.75     | 6.80<br>$\pm 0.06$ | 7.12 | 6.71<br>6.70 |
| 6                       | 6.50     | 6.64<br>$\pm 0.03$ | 6.96 | 6.68<br>6.65 |
| 8                       | 6.42     | 6.55<br>$\pm 0.03$ | 6.90 | 6.66<br>6.65 |

<sup>+</sup>) Konzentration Maltose bzw. Glucose<sup>+</sup> (8 mg/ml)

meter dienten hier wie in den vorausgegangenen Versuchen  $\text{NH}_3\text{-N}$  und DNS einerseits sowie Fermentationsraten und pH-Werte andererseits.

Als Substrat wurden unter Bezug auf die unter 3.1.1 und 3.1.2 mitgeteilten Ergebnisse Stärke und Harnstoff im Verhältnis 1 : 0.1 angeboten, d. h. 8 mg der betreffenden Stärke/ml und 373  $\mu\text{g}$  Harnstoff. Ganz offensichtlich übte die Stärkequalität dabei einen erheblichen Einfluß aus (s.Tab.11).Denn nach Zugabe von löslicher Stärke und Harnstoff erfolgte eine Abnahme des  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehaltes in ähnlichem Umfang wie bei Maltose, während es bei Rohstärke zu einer beträchtlichen Zunahme des  $\text{NH}_3$ -Gehaltes im Fermentor kam. Auch das mikrobielle Wachstum setzte bei Rohstärke später ein, wie aus Tabelle 12 zu ersehen ist.

In Abbildung 2 sind die bei Inkubation mit Rohstärke, Quellstärke und löslicher Stärke erhaltenen Fermentationskurven dargestellt, die mit adaptierter und nicht adaptierter Flora gewonnen wurden. Bezüglich der Stärke zeigte sich eine zunehmend bessere Fermentation in der Reihenfolge Rohstärke - Quellstärke - lösliche Stärke. Die Gesamtfermentation war bei Pansen saft mit adaptierter Flora nach 8 h nahezu abgeschlossen.

Entsprechend verhielten sich die pH-Werte, wie aus Tabelle 13 und 14 zu entnehmen ist. Bei der Pansenflora von adaptierten Tieren sanken sie im Verlauf der Fermentation deutlich ab. Mit Ausnahme der löslichen Stärke war bei nicht adaptierter Flora nach 8 h keine pH-Erniedrigung festzustellen. Hier wurden zum Teil erst nach 20stündiger Inkubationsdauer Werte erreicht, die den 8h-Werten bei adaptierter Flora entsprachen.

Bezüglich der zugegebenen Stärke konnte festgestellt werden, daß lösliche Stärke leichter als Quellstärke und

Tabelle 11

Einfluß von Stärke verschiedener Löslichkeit  
und Maltose auf die Änderung der Konzentration  
von  $\text{NH}_3$ - N bei Inkubation von 2 - 8 h in vitro.

| Substrat     | Versuchstier                           |     |     |     |
|--------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|
|              | S                                      | Q   | K   | R   |
|              | $\text{NH}_3$ - N ( $\mu\text{g/ml}$ ) |     |     |     |
| Rohstärke    | + 3                                    | +86 | +56 | +32 |
| Lösl. Stärke | --                                     | -18 | --  | -32 |
| Maltose      | -37                                    | -54 | -29 | -23 |

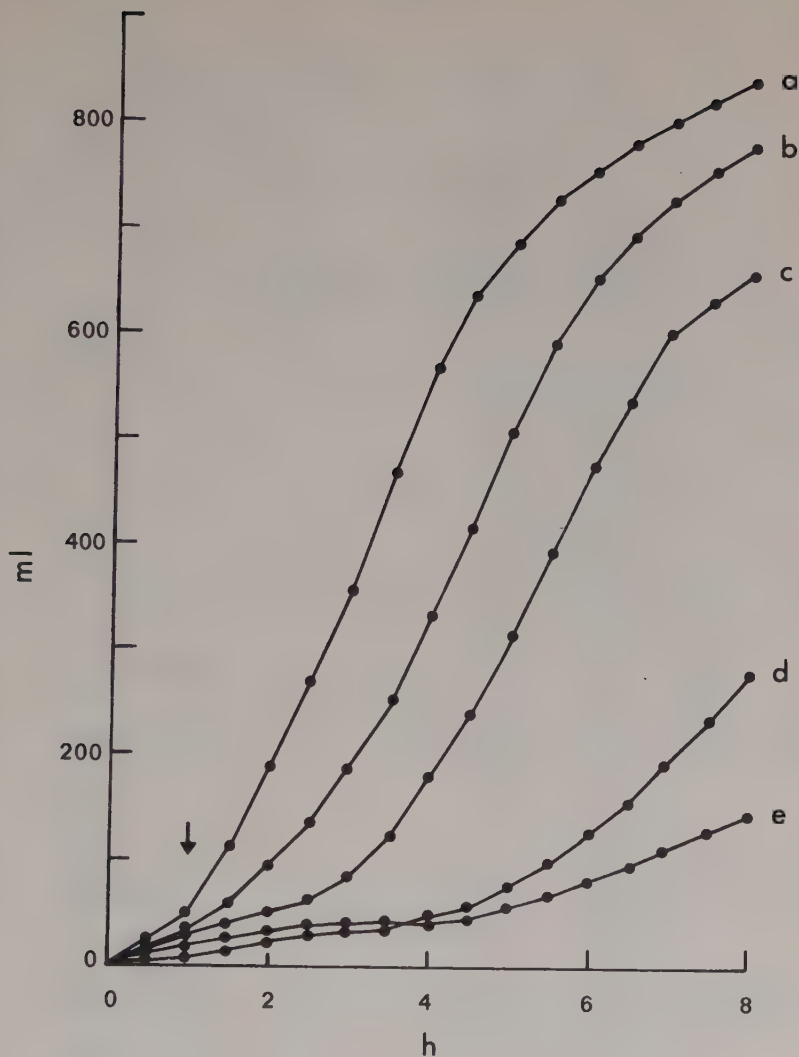


Abb. 2 Gasproduktion (ml) durch die Pansenflora von adaptierten (a,b) und nicht adaptierten (c-e) Schafen bei Inkubation in vitro mit Quellstärke (a,d), Rohstärke (b,e) und lösli. Stärke (c)

↓ Zeitpunkt der Substratzugabe

Tabelle 12

Einfluß von Stärke<sup>+</sup> auf das Wachstum (DNS-Gehalt)\* der Pansenflora in vitro

| Substrat        | Versuchstier | Inkubationsdauer (h) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------|--------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                 |              | 0                    | 2  | 4  | 6  | 8  | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 |
| Rohstärke       | S            | 63                   | 63 | 64 | 68 | 81 | 88 | -- | -- | -- | -- | -- |
|                 | Q            | 39                   | 38 | -- | 40 | 42 | 45 | 45 | -- | -- | -- | -- |
|                 | K            | 49                   | 46 | -- | 47 | 48 | 49 | 51 | 51 | 54 | 61 | 65 |
|                 | R            | 55                   | 51 | -- | 51 | 63 | 71 | 71 | -- | -- | -- | -- |
| Lösliche Stärke | Q            | 23                   | 26 | -- | -- | 39 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
|                 | R            | 24                   | 25 | -- | -- | 40 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

<sup>+</sup>) Gewichtsverhältnis Stärke : Harnstoff 1 : 0.1

\* ) µg/ml

Tabelle 13

pH-Werte in vitro bei Inkubation von Stärke verschiedener Löslichkeit mit nicht adaptierter und adaptierter Pansenflora.<sup>+</sup>

| Substrat               | n | Inkubationsdauer (h) |               |               |               |               |
|------------------------|---|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                        |   | 0                    | 2             | 4             | 6             | 8             |
| nicht adaptierte Flora |   |                      |               |               |               |               |
| Rohstärke              | 4 | 6.80                 | 6.95<br>±0.24 | 7.04<br>±0.17 | 6.99<br>±0.26 | 6.92<br>±0.26 |
| Quellstärke            | 1 | 6.79                 | 6.88          | 6.93          | 6.85          | 6.78          |
| Lösliche Stärke        | 2 | 6.80<br>6.80         | 7.01<br>6.80  | 6.74<br>6.78  | 6.62<br>6.68  | 6.56<br>6.58  |
| adaptierte Flora       |   |                      |               |               |               |               |
| Rohstärke              | 3 | 6.80                 | 6.80<br>±0.0  | 6.60<br>±0.31 | 6.31<br>±0.10 | 6.30<br>±0.31 |
| Quellstärke            | 3 | 6.80                 | 6.78<br>±0.20 | 6.64<br>±0.17 | 6.55<br>±0.10 | 6.49<br>±0.30 |

<sup>+</sup>Gewichtsverhältnis Stärke : Harnstoff 1 : 0.1

Tabelle 14

pH-Werte bei längerer Inkubation einer nicht adaptierten Flora mit Rohstärke<sup>+</sup>

| Tiere | Inkubationsdauer (h) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 0                    | 2    | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   | 14   | 16   | 18   | 20   |
| S     | 6.81                 | 6.88 | 7.06 | 6.69 | 6.52 | 6.50 | 6.40 | 6.34 | 6.38 | --   | --   |
| Q     | 6.79                 | 6.82 | --   | 6.95 | 6.90 | 6.87 | 6.76 | 6.55 | 6.43 | 6.42 | 6.55 |
| R     | 6.80                 | 6.90 | --   | 7.03 | 6.91 | 6.68 | 6.61 | 6.55 | --   | --   | --   |
| K     | 6.81                 | 6.92 | --   | 6.87 | 6.86 | 6.88 | 6.82 | 6.78 | 6.73 | 6.58 | 6.42 |

<sup>+</sup>) Gewichtsverhältnis Rohstärke : Harnstoff 1 : 0.1

Quellstärke schneller als Rohstärke abgebaut wurde. Insgesamt war die Stärkeverdauung in vitro mit Pansensaft adaptierter Flora erheblich besser als bei nicht adaptierter Flora. Die lösliche Stärke verhielt sich in etwa wie die zuvor verwendeten Substrate Maltose und Glucose.

Die Adaptation hatte zur Folge, daß Quell- und Rohstärke noch besser fermentiert wurden als lösliche Stärke durch die Pansenflora von nicht adaptierten Tieren. Neben der Gesamtfermentation trat dies, wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, in der Verzögerung des Fermentationsbeginns deutlich zutage. Auch die pH-Werte konnten diesen Befund bestätigen. Nach 8 h lagen die Mittelwerte für Quell- und Rohstärke mit 6.49 bzw. 6.30 unter denen der löslichen Stärke (6.56, 6.58), während sie bei den Versuchen mit Quell- und Rohstärke im Pansensaft nicht adaptierter Tiere nur den Ausgangswert erreichten (Quellstärke) oder höher lagen (Rohstärke).

Insgesamt kann aus diesen Befunden gefolgert werden, daß bei Rohstärke und Quellstärke die Adaptation der Pansenflora für die Stärkefermentation eine wesentlich größere Rolle spielt als Unterschiede in der Stärkequalität. Im Beginn der maximalen Fermentationsrate (Abb.2) kommt das besonders deutlich zum Ausdruck. Lösliche Stärke wird auch von der nicht an Stärkefütterung adaptierten Pansenflora schnell umgesetzt. Diese Unterschiede werden auch durch pH-Messungen aufgezeigt, doch erscheint die gasometrische Untersuchung des Fermentationsverlaufes empfindlicher.

### 3.2 Adaptationsvorgänge im Pansen bei Stärkefütterung

#### 3.2.1 Stoffwechselvorgänge im Pansen bei hohen Stärkgaben - Überfütterungsversuch mit Mais

Die Versuchsanordnung ist in Abschnitt 2 im einzelnen beschrieben. Hier wurde geprüft, wie sich die spontane Verabreichung von hohen Stärkgaben in vivo auf die bisher untersuchten Parameter auswirkt. Daneben wurde die Stärkverdauung in vitro gemessen. Die Einzelwerte sowie Mittelwerte und Streuungen sind in den Tabellen 15 bis 19 dargestellt und die Mittelwerte in Abbildung 3 graphisch vergleichend dargestellt.

##### 3.2.1.1 Fermentation und Acidität

Am 2. Tag der Maisfütterung erfolgte bei allen Versuchstieren eine Zunahme der Gasproduktion, der am 3. Tag ein merklicher Rückgang folgte. Nach 6tägiger Depression begann die Fermentation mit erheblichen Unterschieden zwischen den Tieren wieder zuzunehmen. (Tab.15).

Eine ähnliche Tendenz zeigten die pH-Werte, die in Tabelle 16 wiedergegeben sind. Bereits am 2. Tag nach der Futterumstellung war bei allen Tieren eine leichte Acidose festzustellen, die sich am 3. Tag noch verstärkte und bei 3 Versuchstieren zu pH-Werten unter 5.0 führte. In der Folge war ein stetiger Anstieg zu verzeichnen. Da Versuchstier M klinische Symptome einer Acidose zeigte, wurde am 14. und 17. Versuchstag 3 mal täglich 1 l einer 1 %igen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung per fistulam infundiert. Dieselbe Maßnahme mußte bei Versuchstier R am 16., 17. und 26. Versuchstag ergriffen werden. Trotz dieser regulierenden Maßnahmen bewegten sich die pH-Werte dieser beiden Versuchstiere stets im Bereich einer leichten Acidose, während sie sich bei den Tieren K und Q gegen Ende der 3. Versuchswoche normalisierten und mit 6.18 bzw. 6.15 Werte erreichten, die über den bei Heufütterung erhaltenen Ausgangswerten lagen. Die anfäng-

Tabelle 15

Gasproduktion des Panseninhalts in vitro beim Überfütterungsversuch<sup>+</sup>)

| Tiere | Versuchstage             |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     | 22 | 29 |
|-------|--------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|----|
|       | 3                        | 4    | 5   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  | 18  |      |     |    |    |
|       | ml Gas /h/g Trockenmasse |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |    |    |
| M     | 8.2                      | 8.3  | 5.9 | 5.4 | 7.2 | 1.9 | 2.2 | 3.2 | 2.0 | 2.7 | 1.4 | 2.1 | 2.5  | 3.3 |    |    |
| K     | 9.1                      | 9.0  | 7.5 | 5.8 | 6.7 | 2.3 | 3.5 | 1.6 | 2.2 | 2.8 | 1.7 | 3.0 | 8.2  | 6.7 |    |    |
| Q     | 9.8                      | 9.9  | 7.5 | 6.0 | 8.7 | 4.6 | 3.2 | 3.3 | 3.4 | 2.5 | 3.0 | 6.3 | 10.2 | 4.0 |    |    |
| R     | 10.1                     | 10.0 | 8.3 | 5.7 | 7.8 | 1.8 | 2.8 | 2.5 | 2.4 | 2.4 | 3.6 | 3.0 | 5.5  | 4.3 |    |    |
| Ø     | 9.3                      | 9.3  | 7.2 | 5.7 | 7.6 | 2.6 | 2.9 | 2.6 | 2.5 | 2.6 | 2.4 | 3.6 | 6.6  | 4.6 |    |    |
|       | 0.9                      | 0.8  | 1.2 | 0.4 | 0.9 | 1.3 | 0.6 | 0.8 | 0.6 | 0.2 | 1.1 | 1.9 | 3.3  | 1.5 |    |    |

<sup>+</sup>) gemessen 4 h nach Fütterung

Tabelle 16

pH-Werte im Pansen beim Überfütterungsversuch<sup>+)</sup>

| Tiere     | Versuchstage |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|           | 1            | 3    | 5    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 18   | 21   | 22   | 29   |
| M         | 6.87         | 7.00 | 6.73 | 6.29 | 6.20 | 5.40 | 4.68 | 4.82 | 4.90 | 4.75 | 5.30 | 5.65 | 5.39 | 5.35 | 5.62 | 5.66 | 5.49 |
| K         | 6.16         | 6.58 | 6.53 | 6.14 | 6.51 | 5.80 | 4.89 | 5.03 | 5.72 | 5.60 | 5.28 | 5.48 | 5.48 | 5.53 | 5.85 | 6.18 | 6.10 |
| Q         | 6.00         | 6.42 | 6.25 | 5.98 | 6.10 | 5.70 | 5.40 | 5.52 | 5.25 | 5.55 | 5.40 | 5.60 | 5.60 | 5.73 | 5.98 | 6.15 | 5.87 |
| R         | 6.41         | 6.55 | 6.42 | 6.36 | 6.60 | 5.80 | 4.49 | 4.98 | 5.63 | 5.42 | 5.14 | 5.05 | 5.10 | 5.57 | 6.26 | 6.10 | 5.60 |
| $\bar{x}$ | 6.36         | 6.63 | 6.48 | 6.19 | 6.35 | 5.67 | 4.86 | 5.08 | 5.37 | 5.33 | 5.28 | 5.44 | 5.39 | 5.54 | 5.92 | 6.02 | 5.75 |
| $\pm s$   | 0.37         | 0.40 | 0.27 | 0.24 | 0.29 | 0.34 | 0.47 | 0.43 | 0.46 | 0.39 | 0.23 | 0.37 | 0.27 | 0.29 | 0.42 | 0.23 | 0.33 |

+) gemessen 4 h nach Fütterung

<sup>+)</sup> gemessen 4 h nach Fütterung

Tabelle 17

Gehalt an Desoxyribonucleinsäure (DNS) im Pansensaft beim Überfütterungsversuch<sup>+</sup>)

| Tiere     | Versuchstage                    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|-----------|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
|           | 3                               | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 18 | 21 | 29 |  |
|           | DNS-Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ ) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| M         | 25                              | 40 | 34 | 50 | 28 | 19 | 18 | 13 | 10 | 16 | 32 | 55 | 61 |  |
| K         | 30                              | 36 | 36 | 35 | 34 | 19 | 20 | 29 | 26 | 34 | 54 | 49 | 66 |  |
| Q         | 23                              | 20 | 28 | 23 | 33 | 28 | 32 | 30 | 40 | 40 | 43 | 47 | 52 |  |
| R         | 26                              | 23 | 23 | 32 | 34 | 17 | 20 | 40 | 32 | 42 | 56 | 48 | 30 |  |
| $\bar{x}$ | 26                              | 30 | 30 | 35 | 32 | 21 | 23 | 28 | 27 | 33 | 46 | 50 | 52 |  |
| $\pm s$   | 3                               | 10 | 6  | 11 | 3  | 5  | 6  | 11 | 13 | 12 | 11 | 4  | 14 |  |

<sup>+</sup>) Gemessen 4 h nach Fütterung

Tabelle 18

NH<sub>3</sub>-N-Gehalt des Pansensaftes beim Überfütterungsversuch<sup>+</sup>)

| Tiere     | Versuchstage |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    | $\mu\text{g NH}_3\text{-N} / \text{ml}$ |    |    |
|-----------|--------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|-----------------------------------------|----|----|
|           | 1            | 3  | 5  | 7  | 8  | 9  | 10  | 11  | 12  | 13 | 14 | 15 |                                         |    | 18 |
| M         | 62           | 88 | 75 | 60 | 41 | 28 | 68  | 92  | 107 | 82 | 65 | 23 | 32                                      | 31 | 46 |
| K         | 71           | 92 | 72 | 58 | 53 | 55 | 124 | 144 | 148 | 59 | 22 | 28 | 25                                      | 83 | 75 |
| Q         | 56           | 60 | 71 | 58 | 36 | 22 | 28  | 50  | 61  | 31 | 24 | 19 | 27                                      | 58 | 20 |
| R         | 55           | 47 | 47 | 44 | 34 | 20 | 103 | 129 | 141 | 29 | 22 | 24 | 27                                      | 22 | 55 |
| $\bar{x}$ | 61           | 72 | 66 | 55 | 41 | 31 | 80  | 103 | 114 | 50 | 33 | 24 | 28                                      | 48 | 48 |
| $\pm s$   | 7            | 22 | 13 | 8  | 8  | 16 | 41  | 42  | 39  | 25 | 20 | 4  | 3                                       | 27 | 23 |

<sup>+</sup>) Gemessen 4 h nach Fütterung

Tabelle 19

Stärkeverdaunung beim Überfütterungsversuch<sup>+</sup>)

| Tiere | Versuchstage   |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | abgebaute Stärke (%) |
|-------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------------|
|       | 4              | 6       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      | 15      | 18      | 22      | 24      | 29      |                      |
| M     | 69             | 66      | 73      | 73      | 76      | 90      | 86      | 81      | 79      | 80      | 94      | 95      | 84      | 79      |                      |
| K     | 55             | 62      | 73      | 77      | 79      | 88      | 86      | 84      | 73      | 70      | 94      | 90      | 78      | 85      |                      |
| Q     | 60             | 78      | 64      | 65      | 93      | 92      | 93      | 87      | 77      | 78      | 77      | 78      | 78      | 88      |                      |
| R     | 65             | 71      | 71      | 66      | 72      | 88      | 94      | 85      | 87      | 80      | 85      | 79      | 87      | 82      |                      |
| Ø     | 67<br>+s<br>-s | 69<br>7 | 70<br>4 | 70<br>6 | 80<br>9 | 89<br>2 | 90<br>4 | 84<br>2 | 78<br>5 | 77<br>5 | 87<br>9 | 86<br>8 | 82<br>4 | 83<br>4 |                      |

<sup>+</sup>) gemessen vor Fütterung

liche Zunahme der Gasproduktion nach der Futterumstellung ist mit dem reichlichen Angebot an leichter umsetzbaren Kohlenhydraten zu erklären. Auf den weiteren Verlauf der Fermentation wird im Zusammenhang mit dem nächsten Abschnitt eingegangen. Das Absinken der pH-Werte kann mit einer schnelleren Bildung von Gärungssäuren aus leicht verdaulichen Kohlenhydraten erklärt werden.

### 3.2.1.2 Mikrobielles Wachstum und Stärkeverdauung in vitro

Wie aus Tabelle 17 und Abbildung 3 zu ersehen ist, kam es parallel zu dem anfänglichen Anstieg der Fermentationsrate zu einer Zunahme des DNS-Gehaltes im Pansensaft, der auf ein verstärktes mikrobielles Wachstum schließen läßt. Die in Tabelle 18 dargestellte Abnahme des Gehaltes an  $\text{NH}_3\text{-N}$  steht damit in Zusammenhang. In der Folge wurde ein Anstieg des  $\text{NH}_3\text{-N}$  bis zum 12. Versuchstag und eine Abnahme des DNS-Gehaltes beobachtet. Nach einer mehrtägigen Einpendelung lagen die DNS-Gehalte ab dem 17. Versuchstag deutlich über den bei Heufütterung gemessenen Werten, was für eine Zunahme der mikrobiellen Zellmasse spricht.

Dem 2tägigen Anstieg der DNS-Werte folgte eine 2tägige Zunahme der Stärkeverdauung in vitro (Tab.19) und anschließend ein merklicher Rückgang. Hier kam es ebenfalls nach 18 Tagen zu einer Einstellung auf Werte, die gegenüber der 1. Versuchswoche auf eine Zunahme der Stärkeverdauung durch längere Verabreichung von Stärke hinwies.

Der zeitliche Verlauf aller Messungen ist in Abbildung 3 vergleichend dargestellt. Er hebt die Wechselwirkung zwischen der Kohlenhydratvergärung (pH, Fermentationsrate, Stärkeverdauung in vitro) und dem N-Stoffwechsel (DNS,  $\text{NH}_3$ ) deutlich hervor. Die nach Futterumstellung erhöhte Kohlenhydratfermentation führte nur vorübergehend zu einer Zunahme des mikrobiellen Wachstums (DNS-Gehalt). Die steigende

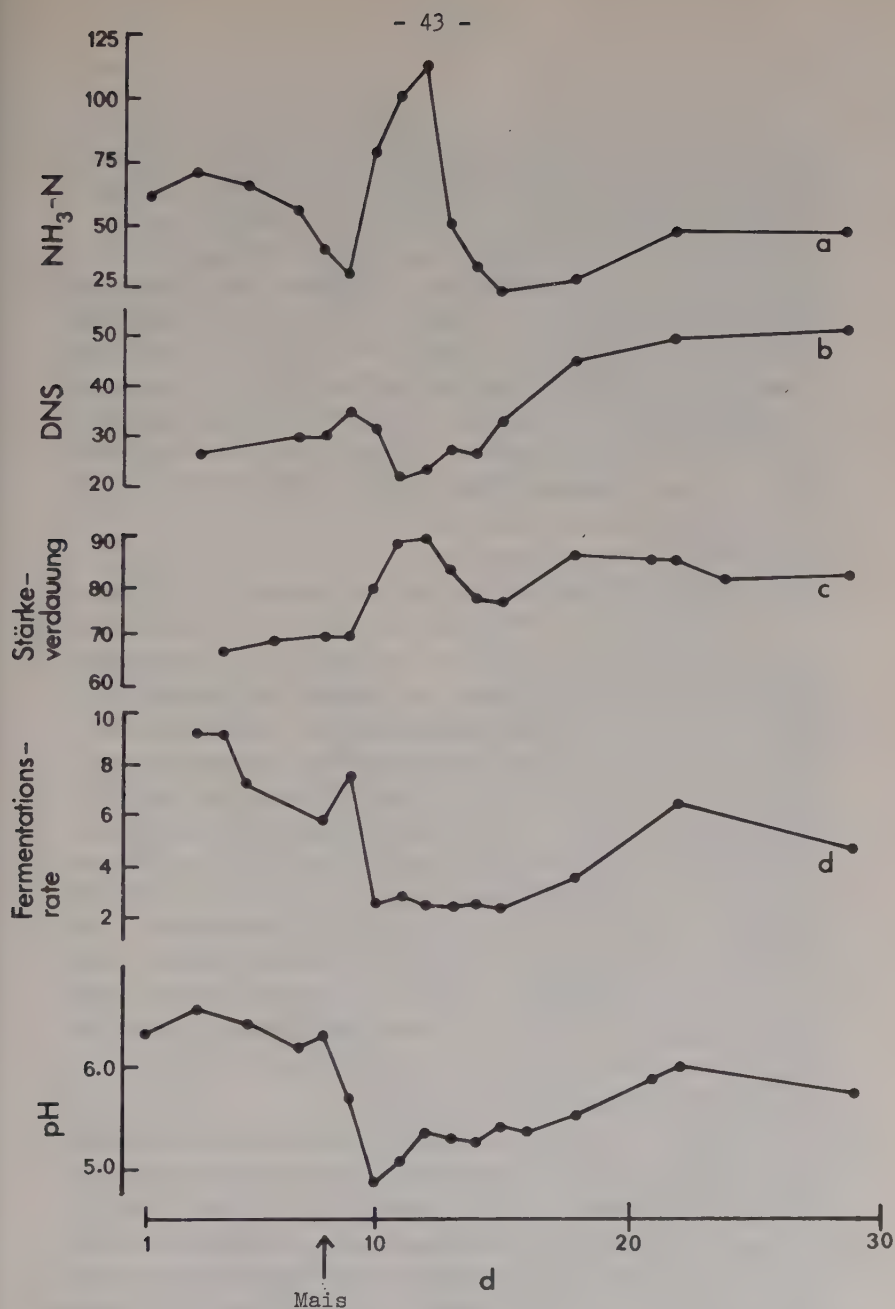


Abb. 3 Änderung von Stoffwechselgrößen im Pansen während eines Überfütterungsversuches mit Mais (Mittelwerte Tab.15-19)

a)  $\mu\text{g NH}_3\text{-N/ml}$ ; b)  $\mu\text{g DNS/ml}$ ; c) abgebaute Stärke in vitro in %; d) ml Gas/min/g Trockensubstanz

Stärkeverdauung erhöhte die Acidität im Pansen (sinkende pH-Werte) unterdrückte aber offensichtlich die Zellvermehrung, so daß es zu einer Anhäufung von  $\text{NH}_3\text{-N}$  infolge verminderter Proteinsynthese kam. Eine verringerte Resorption von  $\text{NH}_3$  bei niedrigeren pH-Werten mag dabei eine zusätzliche Rolle gespielt haben. Die Adaptation der Pansenflora bei pH-Werten um pH 5.3 - 5.8 geht aus der stetigen Zunahme des DNS-Gehaltes und dem steilen Abfall der  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration hervor. - In der zeitlichen Abfolge dieser prinzipiellen Veränderungen ergaben sich zwischen den einzelnen Versuchstieren beträchtliche Unterschiede, die aus den Tabellen ersichtlich sind.

### 3.2.2 Die Aktivität der freien $\alpha$ -Amylase des Pansens in vivo und in vitro

Die Fermentation von Stärke im Pansen hängt maßgeblich von der Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase ab, welche durch Hydrolyse des Polysaccharids die weitere Umsetzung einleitet. Messungen der Enzymaktivität in der zellfreien Pansenflüssigkeit erfolgten im Anschluß an den Überfütterungsversuch (3.2.1) an 2 adaptierten und 2 de-adaptierten, d. h. wieder auf Heurration umgestellten Tieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 wiedergegeben und die Mittelwerte als Kurven in Abbildung 4 dargestellt. Die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase im Pansen der adaptierten Tiere war im Mittel 6fach höher als bei den nicht adaptierten Tieren. Offensichtlich trat aber eine tageszeitliche Abhängigkeit zutage, die 2 bzw. 4 Stunden nach der Fütterung zu erniedrigten Werten führte.

Wie über mehrere Wochen durchgeführte Messungen zeigten (s.Tab.21), blieben die beträchtlichen Unterschiede zwischen adaptierten und nicht adaptierten Tieren trotz individueller Variationen bestehen. Bei letzteren zeichnete sich dabei auch eine einmalige - unbeabsichtigte - Aufnahme von Stärke in einer deutlichen Erhöhung der Amylase-Aktivität ab.

In ergänzenden Experimenten in vitro wurde die zuvor aufgezeigte tageszeitliche Variation der Amylase-Aktivität im Pansen eingehender untersucht. Wie aus den in Tabelle 22 wiedergegebenen Befunden zu ersehen ist, machte sich hier die Abnahme der Amylase-Aktivität nach Stärkegabe noch deutlicher bemerkbar, insbesondere bei Verwendung von Quellstärke als Substrat. Der zeitliche Verlauf und die stärkere wie auch nachhaltigere Depression der Amylaseaktivität in Gegenwart der in feinerer Verteilung vorliegenden Quellstärke lassen darauf schließen, daß die Adsorption des Enzyms an der Substratoberfläche für diese Erscheinung verantwortlich zu machen ist.

Adaptationsversuche mit der Pansenflora in vitro führten zu den in Tabelle 23 gezeigten Ergebnissen. Erwartungsgemäß war die Anfangsaktivität der freien  $\alpha$ -Amylase sehr gering und den in vivo gemessenen Werten vergleichbar. Nach einer Erniedrigung unter die Nachweisgrenze konnten im frühesten Fall nach 8 bzw. 10 Stunden (Tiere S und R) Aktivitätswerte der Amylase verzeichnet werden, die den bei adaptierten Tieren erhaltenen (s.Tab.20 u.21) entsprachen. Besonders auffällig war die rasche Enzymproduktion der Pansenflora von Schaf S : Hier wurden nach 6 Stunden noch Normalwerte gemessen, nach 8 Stunden übertraf die Aktivität bereits die bei adaptierten Tieren erhaltene Größe. Demgegenüber zeichnete sich die Pansenflora der Tiere K und Q durch eine wesentlich langsamere Amylaseproduktion aus; erst nach 16 bzw. 20stündiger Inkubation machte sich der Beginn einer Adaptation bemerkbar.

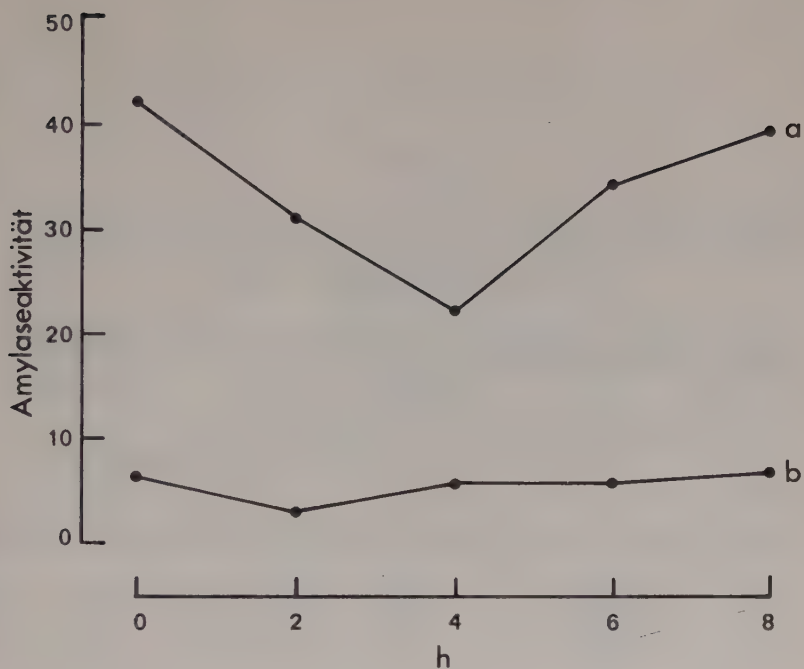
Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen entnommen werden, daß die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase in der zellfreien Pansenflüssigkeit mit hoher Spezifität und Empfindlichkeit auf die Qualität des Stärkesubstrates, dem Zeitpunkt seiner Verabreichung und auf individuelle Eigenschaften der Pansenflora reagiert. Die freie  $\alpha$ -Amylase im Pansen erscheint demzufolge in besonderer Weise geeignet, die Stadien und den Verlauf der Adaptation an stärkereiche Fütterung zu charakterisieren.

Tabelle 20

Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase<sup>+</sup> im Pansen in Abhängigkeit von der Zeit nach Fütterungsbeginn

| Tiere             | Probenentnahme (h) |     |     |     |     |
|-------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|
|                   | 0                  | 2   | 4   | 6   | 8   |
| R                 | 6.0                | 5.2 | 6.6 | 5.7 | 7.3 |
| R nicht adaptiert | 10.0               | 8.7 | 8.3 | 7.7 | 8.8 |
| M                 | 2.5                | 1.7 | 2.8 | 3.3 | 3.7 |
| Ø                 | 6.2                | 3.2 | 5.8 | 5.6 | 6.6 |
| K                 | 42                 | 22  | 12  | 25  | 34  |
| K adaptiert       | 47                 | 30  | 18  | 32  | 36  |
| Q                 | 36                 | 40  | 36  | 47  | 48  |
| Ø                 | 42                 | 31  | 22  | 35  | 39  |

<sup>+</sup>) µg scheinbare Maltose/ml/min



a = adaptierte Tiere

b = nicht adaptierte Tiere

Abb. 4 Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen ( $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose/ml/min) von Schafen mit (a) und ohne (b) stärkeadaptierter Pansenflora vor (0) bzw. nach Fütterung

Tabelle 21

Langzeitiger Verlauf der Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase<sup>+</sup>)  
im Pansen

| Tiere |           | Versuchswoche |     |       |       |     |
|-------|-----------|---------------|-----|-------|-------|-----|
|       |           | 1.            | 2.  | 3.    | 4.    | 5.  |
| R     | nicht     | 2.5           | 4.0 | 4.8   | 3.0   | 3.7 |
| M     | adaptiert | 4.8           | 6.5 | (14.3 | 16.3) | 7.0 |
| K     | adaptiert | 34            | 38  | 33    | 52    | 63  |
| Q     |           | 49            | 35  | 120   | 22    | 41  |

<sup>+</sup>)  $\mu$ g scheinbare Maltose/ml/min, gemessen 2 h nach  
Fütterung

( ) Versuchstier M brach am Vortag aus und nahm Mais auf

Tabelle 22

Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase<sup>a)</sup> in der Pansenflüssigkeit adaptierter Tiere bei Inkubation mit Stärke<sup>b)</sup> von verschiedener Löslichkeit in vitro

| Substrat    | Tiere | Inkubationsdauer (h) |    |    |    |    |
|-------------|-------|----------------------|----|----|----|----|
|             |       | 0                    | 2  | 4  | 6  | 8  |
| Rohstärke   | K     | 34                   | 6  | 28 | 53 | 53 |
|             | K     | 52                   | 11 | 19 | 45 | 49 |
|             | Q     | 22                   | 1  | 4  | 39 | 53 |
|             | Ø     | 36                   | 6  | 17 | 46 | 52 |
| Quellstärke | K     | 30                   | 7  | 5  | 17 | 25 |
|             | Q     | 79                   | 1  | 4  | 6  | 11 |
|             | Q     | 34                   | 1  | 6  | 13 | 21 |
|             | Ø     | 48                   | 3  | 5  | 12 | 19 |

<sup>a)</sup>  $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose/ml/min

<sup>b)</sup> Gewichtsverhältnis Stärke : Harnstoff 1 : 0.1

Tabelle 23

Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase<sup>a)</sup> in der Pansenflüssigkeit nicht adaptierter Tiere  
bei Inkubation mit Rohstärke<sup>b)</sup> in vitro

| Tiere | Inkubationsdauer (h) |      |      |      |      |      |      |     |      |     |      |
|-------|----------------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|------|
|       | 0                    | 2    | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   | 14  | 16   | 18  | 20   |
| S     | 1.5                  | >0.1 | >0.1 | 4.2  | 62.6 | 74.2 | --   | --  | --   | --  | --   |
| R     | 2.7                  | 0.3  | >0.1 | 1.3  | 15.3 | 30.3 | 35.8 | --  | --   | --  | --   |
| Q     | 0.4                  | >0.1 | >0.1 | >0.1 | >0.1 | >0.1 | 1.3  | 5.2 | 14.7 | --  | --   |
| K     | 4.0                  | >0.1 | >0.1 | >0.1 | >0.1 | >0.1 | 0.8  | 0.3 | 2.5  | 8.3 | 16.3 |

<sup>a)</sup>  $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose/ml/min

<sup>b)</sup> Gewichtsverhältnis Stärke : Harnstoff 1 : 0.1

### 3.2.3 Amylaseaktivität und Acidität im Pansen bei steigenden Stärkgaben - Adaptationsversuch in vivo

Hatte der oben dargelegte Überfütterungsversuch (3.2.1) deutlich gemacht, daß eine spontane Verabreichung großer Stärkemengen binnen weniger Tage zu einer starken Erhöhung der Acidität im Pansen führt, so sollte ein weiterer Tierversuch darüber Aufschluß geben, ob sich bei allmählicher Steigerung der Stärkgaben eine Adaptation der Pansenflora erzielen und damit eine Acidose vermeiden läßt. Damit stellte sich zugleich die Frage nach Beziehungen zwischen verabreichter Stärkemenge und Acidität sowie zwischen pH-Wert und Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen, die als Kriterien des Adaptationsverlaufes herangezogen wurden. Bei Eintritt einer subakuten Acidose mit Grenzaciditäten bei pH 5.5 - 5.0 wurden die Maiszulagen abgesetzt, um die De-adaptation zu verfolgen.

Tier R erreichte diese Grenzacidität bereits bei der 20 g Dosierung und verweigerte einen Tag jegliche Futteraufnahme, während Tier S nach 2 Tagen der 60 g - Dosierung eine akute Acidose mit pH-Werten von 4.2 entwickelte.

Die Ergebnisse aller Messungen sind in den Tabellen 24 und 25 zusammengefaßt. Der Versuchsverlauf ist in den Abbildungen 5 bis 8 graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß bei Gaben von 2 g Mais/kg  $G^{3/4}/d$  bei den Tieren K und Q eine anfängliche Erniedrigung des pH-Wertes erfolgte, der sich im Verlauf einer Woche wieder erhöhte, nach erneutem Abfall bei 5 und 20 g/kg  $G^{3/4}/d$  erneut anstieg und bei 60 g/kg  $G^{3/4}/d$  eine starke Depression zeigte, obwohl zu diesem Zeitpunkt bereits über 5 Wochen Mais verabreicht worden war. Bei den Tieren K und Q war also schon bei geringen Dosierungen eine Zunahme der Acidität zu verzeichnen, die bei allen Tieren bei 20 g Mais/kg  $G^{3/4}/d$  deutlich wurde. Gerade diese Tiere jedoch schie-

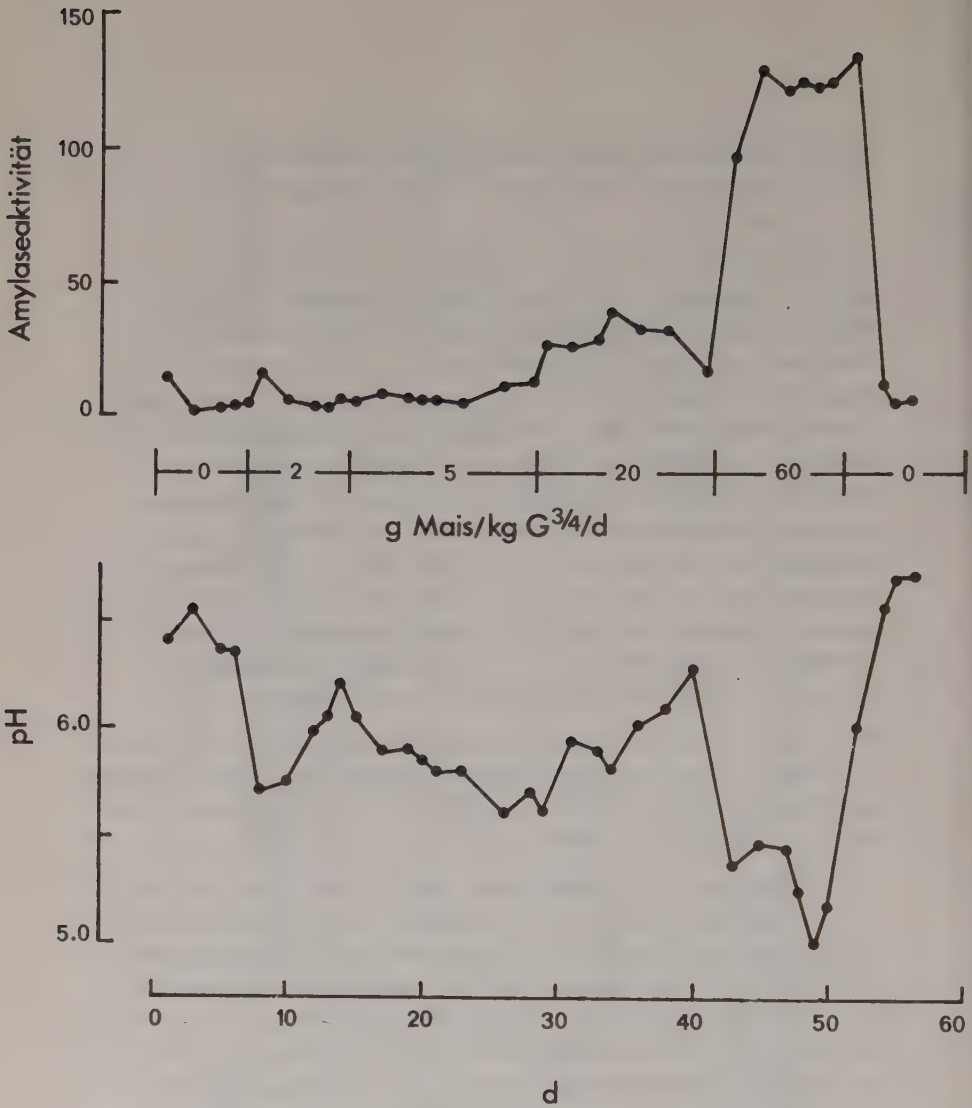


Abb. 5 Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase ( $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose/ml/min) und pH-Wert im Pansen von Schaf K bei steigenden Maiszulagen im zeitlichen Verlauf

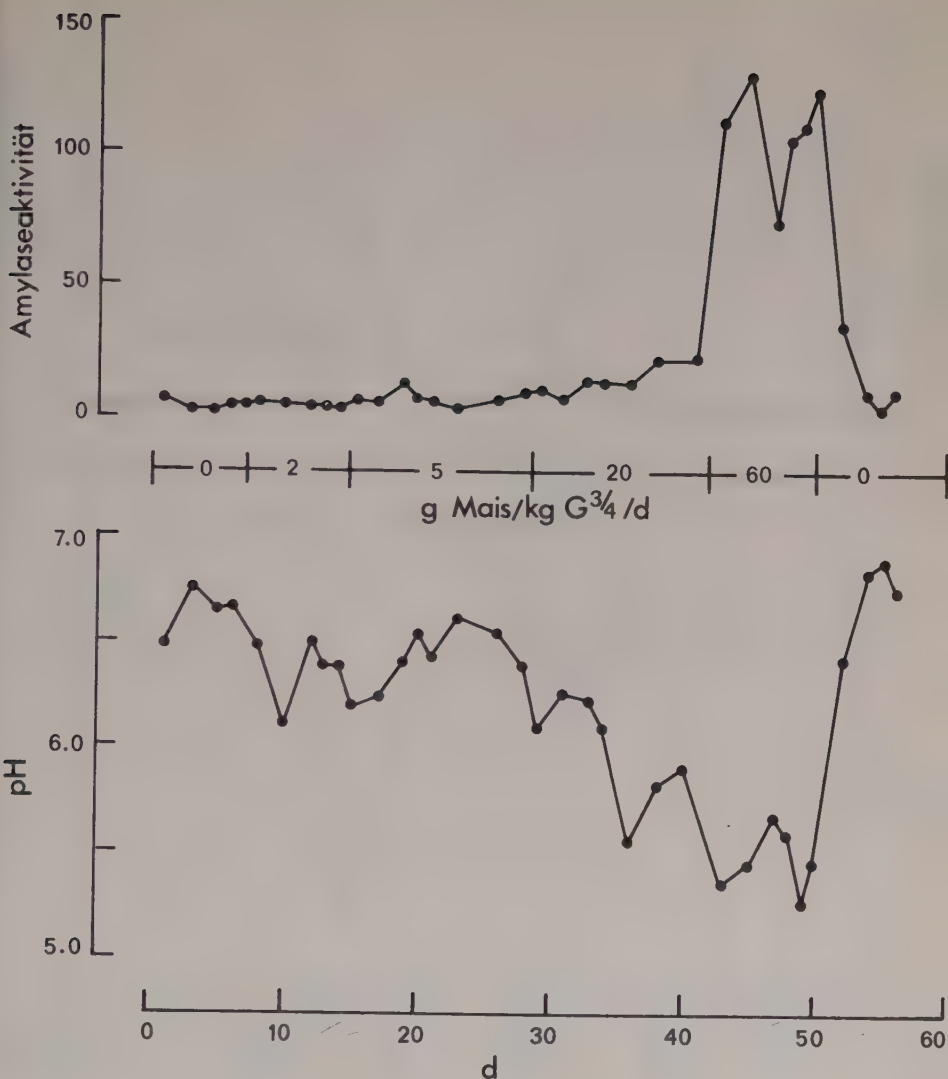


Abb. 6 Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase ( $\mu\text{g}$  scheinbare. Maltose/ml/min) und pH-Wert im Pansen von Schaf Q bei steigenden Maiszulagen im zeitlichen Verlauf

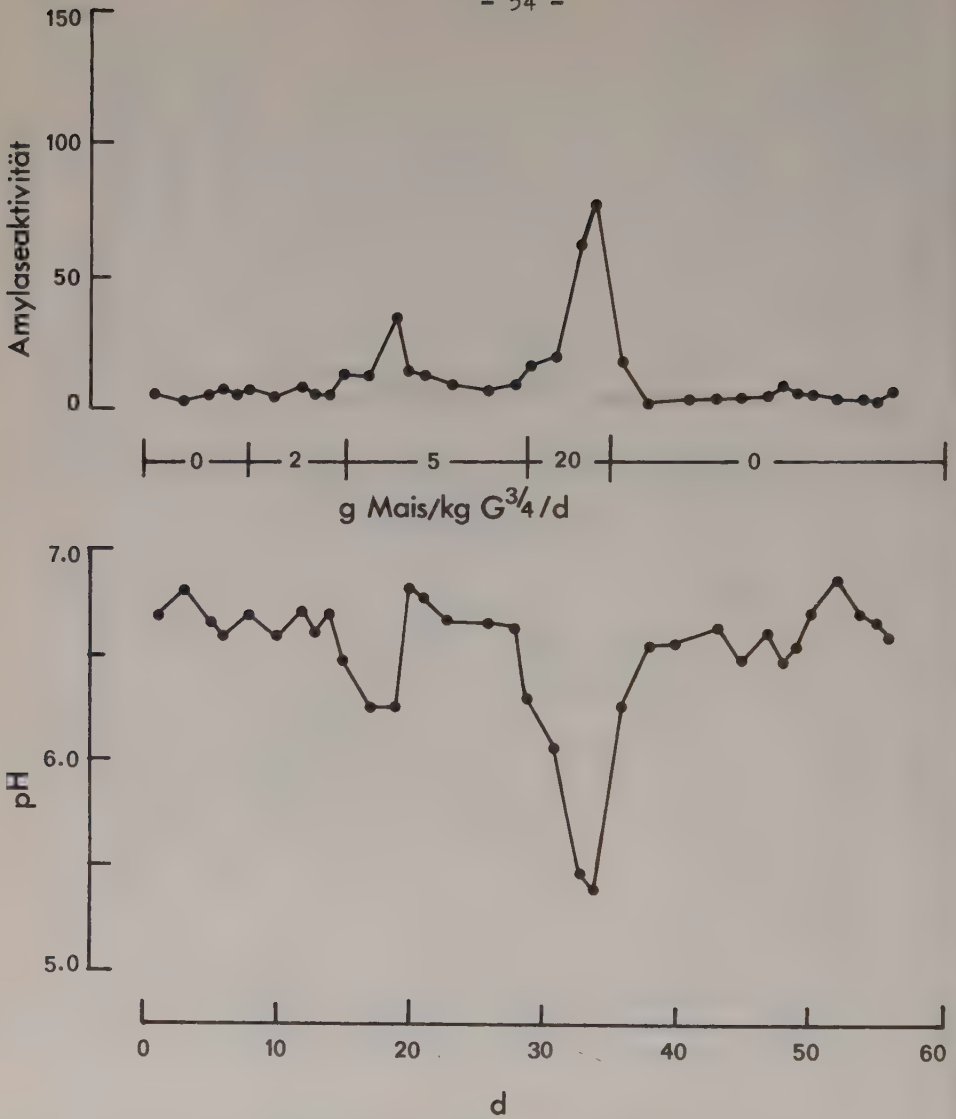


Abb. 7 Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase ( $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose/ml/min) und pH-Wert im Pansen von Schaf R bei steigenden Maiszulagen im zeitlichen Verlauf

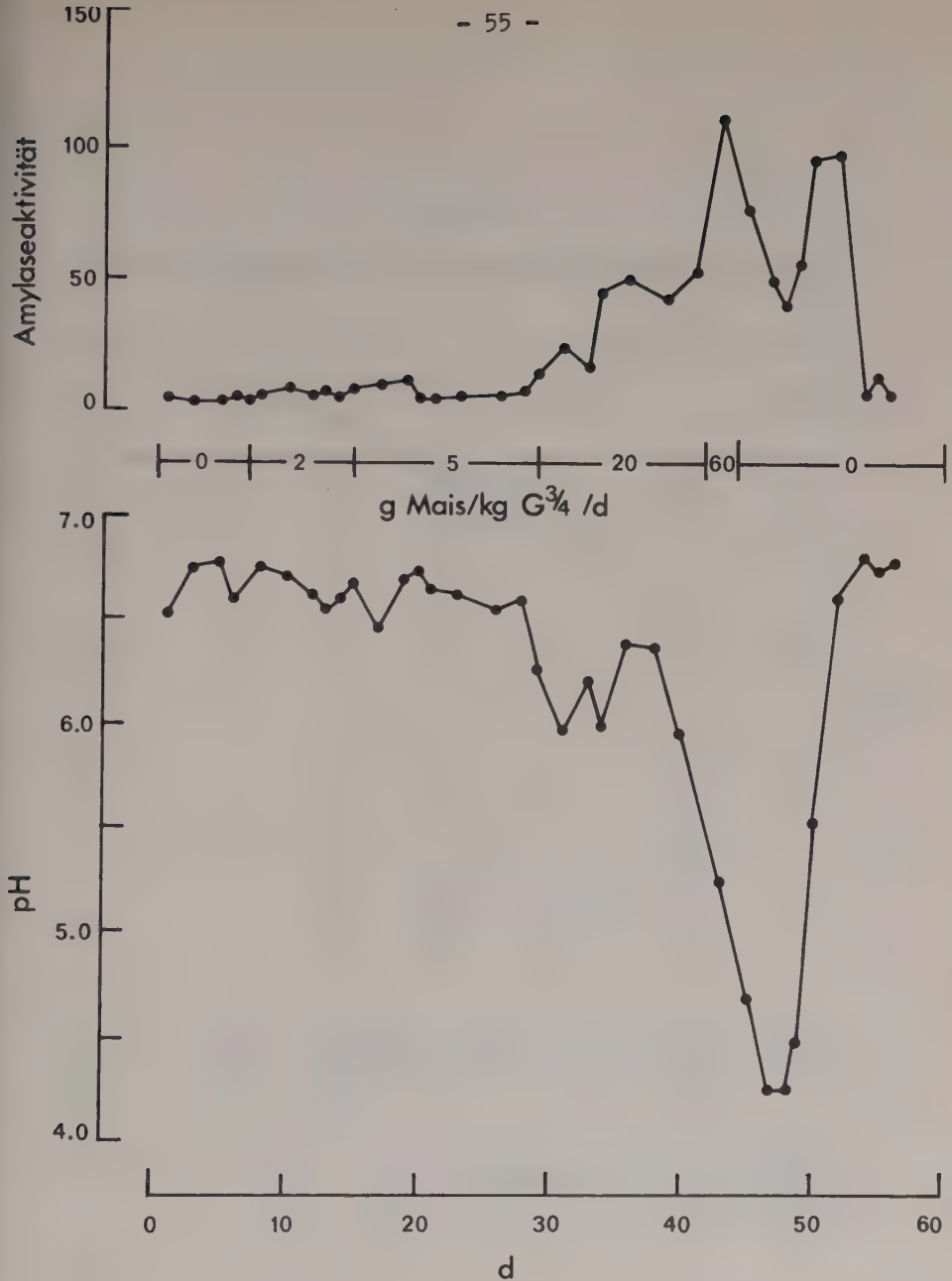


Abb. 8 Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase ( $\mu$ g scheinbare Maltose/ml/min) und pH-Wert im Pansen von Schaf S bei steigenden Maiszulagen im zeitlichen Verlauf

Tabelle 24

Einfluß steigender Maisgaben auf den pH-Wert im Pansen

| Tiere | Verabreichte Maismenge (g/kg G <sup>3/4</sup> /d) |      |      |      |      |      |
|-------|---------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
|       | 0                                                 | 2    | 5    | 20   | 60   | 0    |
| K     | 6.64 <sup>a)</sup>                                | 6.37 | 6.41 | 5.99 | 5.46 | 6.81 |
|       | 0.12                                              | 0.15 | 0.15 | 0.25 | 0.16 | 0.06 |
|       | (4)                                               | (5)  | (8)  | (7)  | (6)  | (3)  |
| Q     | 6.41                                              | 5.94 | 5.83 | 5.96 | 5.29 | 6.67 |
|       | 0.09                                              | 0.21 | 0.13 | 0.21 | 0.19 | 0.09 |
|       | (4)                                               | (5)  | (8)  | (7)  | (6)  | (3)  |
| R     | 6.67                                              | 6.66 | 6.56 | 5.78 |      | 6.61 |
|       | 0.09                                              | 0.06 | 0.22 | 0.45 | --   | 0.11 |
|       | (4)                                               | (5)  | (8)  | (4)  |      | (12) |
| S     | 6.66                                              | 6.65 | 6.63 | 6.17 |      |      |
|       | 0.12                                              | 0.08 | 0.09 | 0.19 | --   | --   |
|       | (4)                                               | (5)  | (8)  | (7)  |      |      |
| Ø     | 6.60                                              | 6.40 | 6.36 | 6.00 | 5.37 | 6.65 |
|       | 0.15                                              | 0.32 | 0.35 | 0.28 | 0.18 | 0.12 |
|       | (16)                                              | (20) | (32) | (25) | (12) | (18) |

a)  $\bar{x} \pm s$  und ( ) Probenzahl

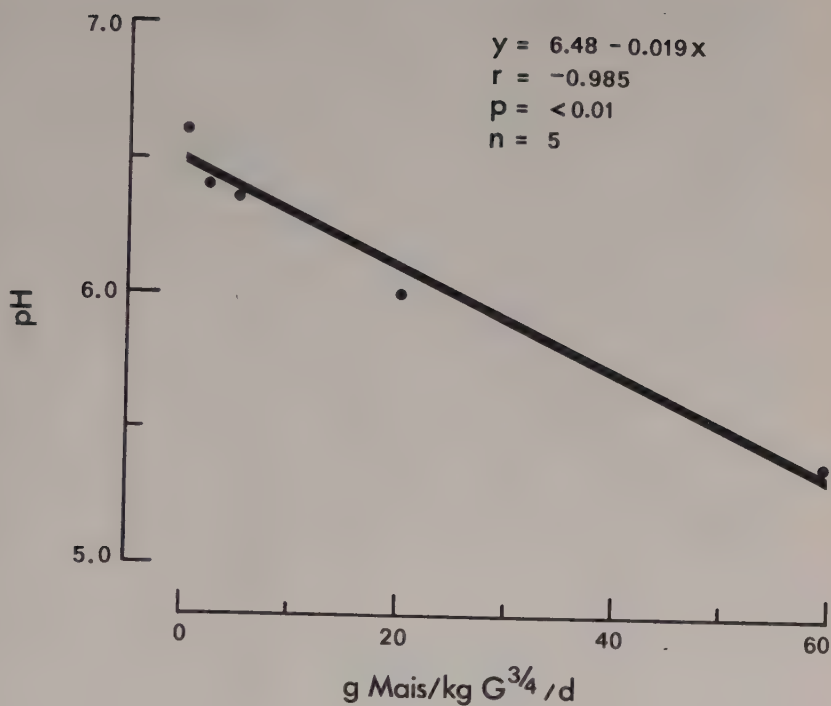


Abb. 9 Beziehung zwischen der täglich verabreichten Maismenge und dem pH-Wert im Pansen

Tabelle 25

Einfluß steigender Maisgaben auf die Amylase-Aktivität<sup>a)</sup>  
im Pansen

| Tiere | Verabreichte Maismenge (g/kg G <sup>3/4</sup> /d) |      |      |      |       |      |
|-------|---------------------------------------------------|------|------|------|-------|------|
|       | 0                                                 | 2    | 5    | 20   | 60    | 0    |
| K     | 3.8 <sup>b)</sup>                                 | 3.8  | 7.2  | 15.0 | 109.6 | 7.2  |
|       | 1.6                                               | 0.6  | 2.9  | 4.9  | 20.0  | 3.1  |
|       | (5)                                               | (5)  | (8)  | (7)  | (6)   | (3)  |
| Q     | 6.0                                               | 7.7  | 8.4  | 30.0 | 119.7 | 8.4  |
|       | 5.3                                               | 5.0  | 2.4  | 7.0  | 11.6  | 3.7  |
|       | (5)                                               | (5)  | (8)  | (7)  | (6)   | (3)  |
| R     | 4.9                                               | 5.8  | 14.0 | 43.9 |       | 4.0  |
|       | 2.0                                               | 1.8  | 9.4  | 30.9 | --    | 1.2  |
|       | (5)                                               | (5)  | (8)  | (4)  |       | (12) |
| S     | 4.0                                               | 6.6  | 8.0  | 36.1 | 103.5 |      |
|       | 1.4                                               | 1.1  | 2.5  | 17.3 | --    | --   |
|       | (5)                                               | (5)  | (8)  | (7)  | (1)   |      |
| Ø     | 4.7                                               | 6.0  | 9.4  | 31.3 | 111.0 | 6.5  |
|       | 1.0                                               | 1.6  | 3.1  | 12.3 | 8.2   | 2.3  |
|       | (20)                                              | (20) | (32) | (25) | (13)  | (18) |

a) µg scheinbare Maltose/ml/min

b)  $\bar{x} \pm s$  und ( ) Probenzahl

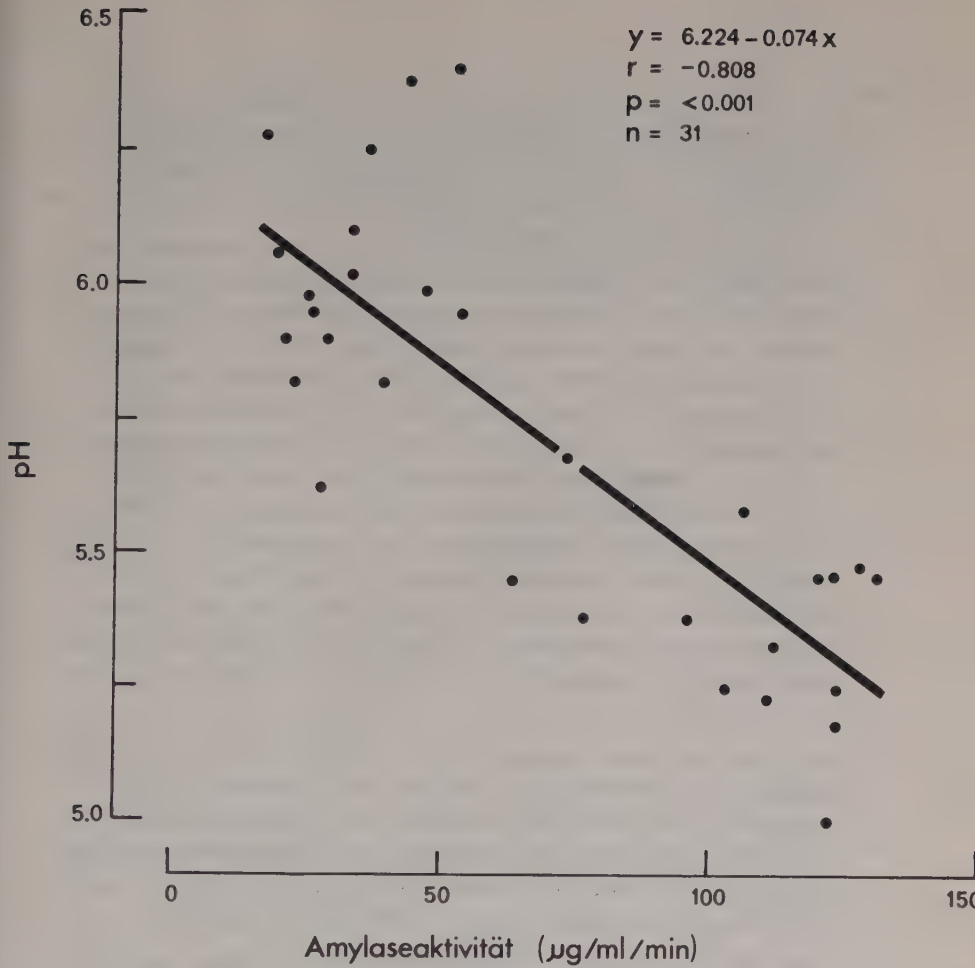


Abb. 10 Beziehung zwischen der Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase und dem pH-Wert im Pansen

nen trotz weiterer pH-Senkung die Höchstmenge an Mais am besten zu vertragen. Das Absetzen der Maiszulagen führte nach 3 Tagen wieder zu Normalwerten, Tier S hingegen erreichte nach akuter Acidose erst nach 7 Tagen wieder physiologische Werte.

Die Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase verhielt sich weitgehend reziprok, wobei die Ausbildung von "Plateaus" bei den einzelnen Dosierungen eine jeweilige Stabilisierung andeutete. Die Amylase-Aktivität wies bei 5 g Mais/kg  $G^{3/4}$  pro Tag in etwa eine Verdoppelung der Anfangswerte auf und stieg von da an mit der Maiszulage. Eine Zunahme der Amylase-Aktivität bei Tier S bei 5 g sowie erhöhte Einzelwerte, wie sie aus der größeren Streuung bei R und S bei 20 g abzulesen sind (Tab.25), mögen schon im voraus auf Komplikationen bei Verabreichung der höheren Mengen hinweisen. Die Normalisierung nach Absetzen der Maiszulage erfolgte wie bei der Acidität innerhalb von 2 - 3 Tagen, bzw. nach 7 Tagen bei Tier S.

Wie aus den Abbildungen 9 und 10 zu ersehen ist, bestanden zwischen der Maiszulage und der als mittlerer pH-Wert ausgedrückten Acidität im Pansen sowie zwischen der Amylase-Aktivität und dem pH-Wert enge lineare Beziehungen. Sie geben in gewisser Weise die Relation zwischen Substratmenge, Enzymaktivität und "Produkt" wieder.

Aus den Berechnungen wurden die jeweils ersten unmittelbar nach Absetzen der Maiszulage erhaltenen Wertpaare eliminiert. Bei der in Abbildung 10 dargestellten Beziehung handelte es sich nicht um eine Aktivitäts - pH - Kurve, wie sie zur Charakterisierung von Enzymen durch Messung der Aktivität bei variierenden pH-Werten aufgestellt wird. Die Messung der Amylase-Aktivität erfolgte vielmehr nach der Bernfeld-Methode bei konstantem

pH von 6.9. Außerhalb des in Abbildung 10 gezeigten Bereiches liegende Meßwerte blieben unberücksichtigt, weil sie nicht der linearen Beziehung folgten. Insbesondere ergab sich für einzelne Messungen unter pH 5 eine deutliche Erniedrigung der Amylaseaktivität, so für pH 4.25 bzw. 4.49 Amylasewerte von 51.8 und 58.8  $\mu\text{g/ml/min}$ . Demnach wurde die Produktion freier Amylase unterhalb der Grenzacidität von pH 5 deutlich unterdrückt.

#### 4. DISKUSSION

##### 4.1 Zusammenhänge zwischen Kohlenhydrat- und N-Stoffwechsel im Pansen

Die Pansenflora ist bei Fütterung von Rauhfuttermitteln nicht auf die Umsetzung von Stärke eingestellt. Die Keimzahlen der amylolytischen Flora betragen unter solchen Bedingungen mit  $10^7 - 10^8$  / g (GILCHRIST u. KISTNER, 1962) weniger als 1 % der kultivierbaren Bakterien. Demgegenüber wird Maltose, das Hydrolyseprodukt der Stärke, spontan als Energiequelle verwertet und zur Bildung mikrobieller Zellmasse unter Ausnutzung des freien  $\text{NH}_3\text{-N}$  herangezogen, wie aus den Tabellen 7 und 8 ersichtlich ist. Die Verfügbarkeit von  $\text{NH}_3\text{-N}$  wirkt sich dabei nur bedingt limitierend auf die Fermentation aus. Geht das Angebot von  $\text{NH}_3\text{-N}$  über das ermittelte Optimalverhältnis 1 : 0.1 von Kohlenhydrat : Harnstoff hinaus, so kommt es sogar zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Fermentation (vgl. Tab. 9 u. 10). Das aus der Fütterung proteinfreier Harnstoffrationen bekannte Verhältnis von 1 kg leicht verdaulicher Kohlenhydrate pro 100 g Harnstoff (VIRTANEN, 1966) scheint nicht nur für adaptierte Tiere optimal zu sein, sondern gleichermaßen für die Umstellung der Pansenflora auf Stärkerationen. Daß Zucker dabei gerade für das Anlaufen der mikrobiellen Zellsynthese erforderlich sind, wenn Amylasen noch nicht genug Stärke spalten, liegt auf der Hand.

Welche Rolle hierfür die Löslichkeit der Stärke spielen kann, geht aus den Tabellen 11 - 14 und aus Abbildung 2 hervor. So führte Rohstärke als Substrat zu einer erheblichen Zunahme des freien  $\text{NH}_3\text{-N}$  infolge vermehrter Proteolyse, während mit löslicher Stärke eine vergleichbare Utilisation von  $\text{NH}_3\text{-N}$  erzielt wurde, wie mit Maltose.

Schon die ersten Versuche von PHILLIPSON u. MC ANALLY (1942) zeigten, daß es nach spontaner Verabreichung von Stärke

viele Stunden dauert, bis die Umsetzung des Substrates anläuft. Daß die "Aufschließung" von Stärke bei feuchter Hitze auch die Verdaulichkeit im Pansen verbessert, ist aus ähnlichen Versuchen (SALSBURY et al., 1960) bekannt. Daneben bestehen Unterschiede in der Stärkeart, die eine abnehmende Verwertbarkeit in der Reihenfolge Reis-, Weizen-, Tapioka-, Mais- und Kartoffelstärke zeigen (TREMOLIERES et al., 1959).

Viel auffälliger macht sich, wie aus Abbildung 2 ersichtlich, eine Adaptation der Mikroorganismen im Pansen an Stärke bemerkbar. So wurde Rohstärke von der adaptierten Flora schneller fermentiert als lösliche Stärke von einer nicht adaptierten Population. Auf derartige Adaptationseffekte weisen bereits Fütterungsversuche von TCPPS et al. (1968) hin. Die später zu erörternde Adaptation der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen scheint dabei eine maßgebliche Rolle zu spielen.

Zeigten die zuvor besprochenen Daten welche Wechselbeziehungen zwischen Energie- und Stickstoffquellen hinsichtlich der Pansenflora selbst von Bedeutung sind, so müssen andererseits auch Regulationsmechanismen des Wiederkäuers einbezogen werden, wie sie nur im Tierversuch aufzuzeigen sind. Die zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wichtige Speichelsekretion steht dabei im Vordergrund (GIESECKE u. BARTELMUS, 1972).

Nach den in den Tabellen 15 - 19 wiedergegebenen und in Abbildung 3 zusammengefaßten Befunden führt die spontane Verabreichung hoher Stärkegaben nicht nur zu Veränderungen des Gärungsstoffwechsels, sondern auch zu einer deutlichen Beeinflussung des N-Stoffwechsels, wie er bisher noch nicht genügende Beachtung fand. Die bei erniedrigtem pH-Wert trotz Depression des mikrobiellen Wachstums zunehmende Stärkeverdauung läßt auf eine tiefgreifende Umstrukturierung der mikrobiellen Flora mit erhöhter Bildung von

Amylasen schließen. Die hohe Wachstumsgeschwindigkeit amylolytischer Bakterien wie *Streptococcus bovis* ist bekannt (GIESECKE, 1973) und erfolgte hier offenbar auf Kosten anderer Keime. Die erhöhte Verfügbarkeit von freiem  $\text{NH}_3\text{-N}$ , der von *S. bovis* als N-Quelle verwertet wird (BRÜGGEMANN u. GIESECKE, 1965), mag diese Entwicklung begünstigt haben. EL-SHAZLY et al. (1961) haben eine Verarmung von  $\text{NH}_3\text{-N}$  im Pansen bei Umstellung auf Stärkerationen festgestellt und diese für die Unterdrückung der Celluloseverdauung verantwortlich gemacht. Zwar wurde letztere hier nicht untersucht, doch kam es offenbar zu einem erhöhten Angebot von  $\text{NH}_3\text{-N}$  und nicht zu einem Mangel. Die Klärung dieses Widerspruchs wird weiterer Untersuchungen bedürfen.

#### 4.2 Zur Bedeutung der freien $\alpha$ -Amylase für die Adaptation an Stärke

Für die Adaptation der Pansenflora an die Stärkeverdauung dürfte der Bildung von freier Amylase im Pansen besondere Bedeutung zuzuschreiben sein. Abgesehen von einer Charakterisierung des aus Reinkulturen von *S. bovis* erhaltenen Enzyms (HOBSON u. MCPHERSON, 1953) und von Untersuchungen über die Wirkungsweise (WALKER u. HOPE, 1964) wurde diesem Enzym bisher auffallend geringe Beachtung geschenkt. Nach den eigenen Befunden (vgl. Tab. 21-23 und Abb. 4) erscheint die Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen die Adaptation der Flora an Stärke besonders sinnfällig zu kennzeichnen. Darüberhinaus kann aus der Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Qualität der als Substrat zugesetzten Stärke in gewisser Weise die Umsetzbarkeit des Stärkepräparates abgelesen werden, da die Aktivitätsminderung (vgl. Tab. 22) offenbar mit der Adsorbierbarkeit bzw. Oberflächenstruktur des Substrats in Zusammenhang steht.

So erscheint es naheliegend die Adaptation der Pansenflora an steigende Stärkegaben anhand der Aktivität der freien

$\alpha$ -Amylase und des pH-Wertes zu verfolgen (vgl.Tab.5-8). Abgesehen von individuellen Unterschieden, auf die noch einzugehen ist, kann aus dem zeitlichen Verlauf dieser Untersuchungen geschlossen werden, daß offenbar erst eine Erhöhung der Amylase-Aktivität auf das Vielfache des Ausgangswertes zu einer drastischen Senkung des pH-Wertes im Pansen in den für eine subakute Acidose charakteristischen Bereich um pH 5.5 (GIESECKE u. BARTELMUS, 1972) führt. Daß dabei deutliche Beziehungen zwischen verabreichter Stärkemenge und Acidität und zwischen Amylaseaktivität und Acidität bestehen, geht aus Abbildung 9 bzw. 10 hervor.

TREMERE et al. (1968) haben in Versuchen an Rindern gezeigt, daß die pH-Senkung im Pansen dabei nicht allein für die bei solcher Fütterung zu beobachtende Futterverweigerung ("off feed") verantwortlich gemacht werden kann. Bei täglichen Maiszulagen von 7 g/kg G<sup>3/4</sup> werden für die Adaptation wenigstens 3 Wochen benötigt.

Im Vergleich zu dem früher erörterten Versuch (vgl.3.2) einer spontanen Futterumstellung auf Maisgaben, die in etwa der hier verabreichten Höchstmenge entsprachen, dauerte die Adaptation bei langsam steigenden Zulagen wesentlich länger. Daraus muß geschlossen werden, daß die Erniedrigung des pH-Wertes unter pH 6, ausgelöst durch hohe Stärkengaben, gewissermaßen eine Voraussetzung für die Entwicklung der amylolytischen Flora darstellt. So gesehen könnte die eingangs erörterte Umgehung der Stärkeverdauung im Pansen mit begrenzten Stärkemengen bzw. durch intermittierende Verabreichung der Stärke möglich erscheinen, kaum aber mit hohen Stärkengaben.

Hinsichtlich der individuellen Unterschiede läßt sich den unter 3.2.3 dargelegten Ergebnissen entnehmen (vgl.Tab.24 u.25), daß offensichtlich die Tiere (R u. S), bei denen der pH-Wert im Pansen während der steigenden Stärkengaben in einem Bereich über pH 6.5 bleibt, bei hoher Stärkefütterung die ausgeprägtesten Symptome der Pansenacidose ent-

wickeln. Auffälligerweise zeigte gerade die Pansenflora dieser Tiere bei Versuchen in vitro (vgl.Tab.23) eine besonders rasche Adaptation der Amylase-Aktivität. Es erscheint naheliegend, daß für solche individuelle Verschiedenartigkeit wie sie auch von anderen Autoren (ALLISON et al.,1964; TREMERE et al.,1968; GIESECKE,1969; DIRKSEN,1970) immer wieder berichtet worden ist, Faktoren der physiologischen Regulation wie Speichelsekretion und Resorption der Säuren eine besondere Rolle spielen. PH-regulierende Einflüsse der Protozoenfauna (HARMEYER, 1973) und lactilytische Bakterienarten (GIESECKE,1973), welche die gebildete Milchsäure in weniger stark dissoziierte kurze Fettsäuren umsetzen, kommen als zusätzliche mikrobielle Faktoren gleichermaßen in Betracht. Die Aufklärung dieser genannten Faktoren muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Die Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase als Kriterium der Adaptation an Stärke und ihre hier aufgezeigte Beziehung zur Acidität im Pansen könnte sich dabei als besonders nützlich erweisen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

An 5 erwachsenen Schafen mit Pansenkanülen wurden Untersuchungen über Adaptationsvorgänge im Pansenstoffwechsel bei spontaner und bei stufenweise gesteigerter Verabreichung hoher Maisgaben durchgeführt. Ergänzende Versuche an der Pansenflora in vitro dienten dazu, Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen sowie die Fermentation von verschiedenartigen Stärkepräparaten zu kennzeichnen. Gemessen wurden Fermentationsraten und pH-Werte, Stärkeverdauung in vitro und Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase sowie die Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff und Desoxyribonucleinsäuren. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Maltose wurde von der Pansenflora ohne Gewöhnung schnell fermentiert und zur Ausnutzung von freiem  $\text{NH}_3\text{-N}$  für die Synthese mikrobieller Zellmasse herangezogen. Das optimale Gewichtsverhältnis von Kohlenhydrat zu Harnstoff ergab sich zu 1 : 0.1.
2. Lösliche Stärke wurde unter gleichen Bedingungen ebenso gut genutzt wie Maltose, Quellstärke und Rohstärke erst nach Adaptation der Pansenflora und dann besser als zuvor lösliche Stärke. Die Fermentation von Stärke hing somit mehr von der Adaptation der Flora als von der Qualität des Substrates ab.
3. Bei spontanem Futterwechsel von Heu auf Heu + Mais (400 g + 1200 g) erfolgte binnen 3 Tagen eine Zunahme der Acidität im Pansen auf pH-Werte um 5 mit Erniedrigung der Fermentationsrate, Zunahme der Stärkeverdauung in vitro und verringerter Ausnutzung von freiem  $\text{NH}_3\text{-N}$  für die mikrobielle Zellsynthese. Die Adaptation war im Mittel nach 10 Tagen erreicht.

4. Nicht adaptierte und adaptierte Tiere zeichneten sich durch einen deutlichen Unterschied in der Aktivität der freien  $\alpha$ -Amylase im Pansen aus, die im Mittel 5 bzw. 30 - 40  $\mu\text{g}$  scheinbare Maltose / ml  $\cdot \text{min}^{-1}$  entsprach und von der Qualität des Stärkesubstrates sowie von individuellen Eigenschaften der Pansenflora beeinflusst wurde.
5. Bei stufenweiser Steigerung der täglichen Maiszulage von 2 auf 60 g/kg  $\text{G}^{3/4}$  erfolgte eine Adaptation der Pansenflora, die durch einen sprunghaften Anstieg der Amylaseaktivität bei Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 5.5 - 5.0 gekennzeichnet war.
6. Zwischen der verabreichten Maismenge und dem pH-Wert im Pansen bestand eine enge Beziehung ( $r = -0.985$ ;  $p < 0.01$ ), ebenso zwischen der Amylaseaktivität und dem pH-Wert im Pansen ( $r = -0.808$ ;  $p < 0.001$ ). Bei pH-Werten unter pH 5 erniedrigte sich die Amylaseaktivität etwa auf halbmaximale Werte.

## S U M M A R Y

Experiments on the adaptation of rumen metabolism by spontaneous and gradually increased changes to high supplements of maize were performed on 5 adult sheep fitted with rumen cannulas. In vitro experiments with the rumen microflora were conducted in order to characterize the relationship between carbohydrate and nitrogen sources and the fermentation of different starch preparations. The criteria used were fermentation rates and pH-values, in vitro digestion of starch and the activity of free  $\alpha$ -amylase as well as the concentrations of ammonia nitrogen and desoxyribonucleic acids. The following results were obtained:

1. Maltose was readily fermented by the rumen microbiota without adaptation with utilization of free  $\text{NH}_3\text{-N}$  for the synthesis of microbial mass. The optimum weight relation of carbohydrate to urea was 1 : 0.1.
2. Soluble starch was utilized under similar conditions as well as maltose, whereas swollen starch and raw starch were only fermented after microbial adaptation and then more readily than soluble starch prior to this change. Thus starch fermentation was more dependent on microbial adaptation than on the quality of the substrate.
3. After changing sheep spontaneously from hay to hay + maize (400 g + 1200 g) rumen pH dropped within 3 days to about pH 5, fermentation rate decreased while in vitro starch digestion increased and the utilization of free  $\text{NH}_3\text{-N}$  for microbial synthesis was reduced. The adaptation was accomplished after a meantime of 10 days.

4. Non-adapted and adapted sheep differed markedly by the activity of free  $\alpha$ -amylase in the rumen, which averaged 5 and 30 - 40 ug apparent maltose / ml . min<sup>-1</sup> and was influenced by starch quality and individual characters of the rumen microbiota.
5. By gradually increasing the daily maize supplements from 2 to 60 g/kg W<sup>3/4</sup> over 5 weeks adaptation was only achieved at 20 - 60 g/kg W<sup>3/4</sup> as was indicated by a drastic increase of amylase activity coinciding with a drop in pH to values of 5.5 - 5.0.
6. Close correlations existed between the amount of maize fed daily and rumen pH ( $r = -0.985$ ;  $p < 0.01$ ) and between rumen amylase activity and pH ( $r = -0.808$ ;  $p < 0.001$ ). At pH-values below pH 5 amylase activity dropped to about half-maximal values.

## 6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Allison, M. J., J. A. Bucklin u. R. W. Dougherty, 1964  
J. Anim. Sci. 23, 1164
- Armstrong, D.G. u. D.E. Beever, 1969  
Proc. Nutr. Soc. 28, 121
- Bergmeyer, H. U. u. H. Bernt, 1962  
in: H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen  
Analyse, S. 123  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- Bergner, H. u. H.-A. Ketz, 1969  
Verdauung, Resorption, Intermediärstoffwechsel bei  
landwirtschaftlichen Nutztieren  
VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin
- Bernfeld, P., 1955  
in: S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in  
Enzymology, Vol. I, S. 149  
Acad. Press, New York
- Brüggemann, J. u. D. Giesecke, 1963  
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 18, 215
- Brüggemann, J. u. D. Giesecke, 1965  
Zbl. Bakt. ParasitKde (Abt. I) 197, 347
- Burton, K., 1956  
Biochem. J. 62, 315
- Catalano, A. u. V. Russo, 1967  
Riv. Zootec. Agric. Vet. 5, 317

- Christian, K. R. u. V. J. Williams, 1966  
J. Agric. Sci. 66, 285
- Clapperton, J. L. u. K. L. Blaxter, 1965  
Proc. Nutr. Soc. 24, XVI (Abstr.)
- Clary, J. J., G. E. Mitchell jr. u. C. O. Little, 1967  
J. Anim. Sci. 26, 917 (Abstr.)
- Conway, E. J., 1958  
Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 4th ed.  
The Macmillan Co., New York
- Crichton, J. A. u. T. R. Preston, 1963  
in: D. P. Cuthbertson: Progress in Nutrition and  
Allied Sciences  
Edinburgh - London
- Dirksen, G., 1970  
in: A. T. Phillipson: Physiology of Digestion and  
Metabolism in the Ruminant, S. 612  
Oriel Press ltd., Newcastle
- Dirksen, G., 1973  
in: D. Giesecke u. H. K. Henderickx: Biologie und  
Biochemie der mikrobiellen Verdauung, S. 256  
BLV Verlagsgesellschaft, München - Bern - Wien
- Doetsch, R. N., R. Q. Robinson u. J. C. Shaw, 1952  
J. Anim. Sci. 11, 536
- El-Shazly, K., B. A. Dehority u. R. R. Johnson, 1961  
J. Anim. Sci. 20, 268

- Friedemann, Th. E., F.W. Norman, B.W. Neighbors u.  
C.W. Weber, 1967  
J. Nutr. 91, 1
- Giesecke, D., 1969  
Hülsenberger Gespräche, S. 46
- Giesecke, D., 1973  
in: D. Giesecke u. H. K. Henderickx: Biologie und  
Biochemie der mikrobiellen Verdauung, S. 9  
BLV Verlagsgesellschaft, München - Bern - Wien
- Giesecke, D. u. C. Bartelmus, 1972  
Tierärztl. Umschau 27, 371
- Gilchrist, F. M. C. u. A. Kistner, 1962  
J. Agric. Sci., Camb. 59, 77
- Harmeyer, J., 1973  
in: D. Giesecke u. H. K. Henderickx: Biologie und  
Biochemie der mikrobiellen Verdauung, S. 58  
BLV Verlagsgesellschaft, München - Bern - Wien
- Heald, P. J., 1951  
Brit. J. Nutr. 5, 84
- Hembry, F. G., M. C. Bell u. R. F. Hall, 1967  
J. Nutr. 93, 175
- Hobson, P. N. u. M. MacPherson, 1952  
Biochem. J. 52, 671
- Hofmann, P., 1971  
in: Rindermast im spezialisierten Betrieb  
BLV Verlagsgesellschaft, München

- Hungate, R. E., 1966  
The Rumen and its Microbes  
Academic Press, New York - London
- Jarrett, I. G., 1948  
J. Coun. scient. ind. Res. Aust. 21, 311
- Johnson, R. R., 1963  
J. Anim. Sci. 22, 792
- Karlson, P., 1972  
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und  
Naturwissenschaftler  
Verlag G. Thieme, Stuttgart
- Karr, M. R., C. O. Little u. G. E. Mitchell jr., 1966  
J. Anim. Sci. 25, 652
- Larsen, H. J., G. E. Stoddard, N. L. Jacobson u.  
R. S. Allen, 1966  
J. Dairy Sci. 15, 473
- Larson, B. Y., 1963  
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 18, 209
- Mangold, E., 1929  
Handbuch der Ernährung und des Stoffwechsels der  
landwirtschaftlichen Nutztiere, Bd. 2, Verdauung  
und Ausscheidung  
Springer-Verlag, Berlin
- McDougall, E. I., 1948  
Biochem. J. 43, 99

- Nasr, H., 1950  
J. Agric. Sci. 40, 308
- Ørskov, E. R., C. Fraser, V.C. Mason u. S. O. Mann, 1970  
Brit. J. Nutr. 24, 671
- Orth, A. u. W. Kaufmann, 1961  
Die Verdauung im Pansen und ihre Bedeutung für die  
Fütterung der Wiederkäuer  
Paul Parey, Hamburg - Berlin
- Otto, E., 1958  
Biometrie  
Deutscher Bauernverlag, München
- Phillipson, A. T. u. R. A. McAnally, 1942  
J. exp. Biol. 19, 199
- Ryan, R. K., 1964  
Am. J. vet. Res. 25, 646
- Salsbury, R. L., J. A. Hoefer u. R. W. Luecke, 1960  
J. Anim. Sci. 19, 1290 (Abstr.)
- Scharrer, E., 1973  
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. (im Druck)
- Scharrer, E., D. Eisfeld u. J. Brüggemann, 1972  
Zbl. Vet. Med. A. 19, 523
- Siddons, R. C., 1968  
Biochem. J. 108, 839
- Topps, J. H., R. N. B. Kay u. E. D. Goodall, 1968  
Brit. J. Nutr. 22, 261

- Tremere, A. W., W. G. Merrill u. J. K. Loosli, 1968  
J. Dairy Sci. 51, 1065
- Tremolière, J., J. J. Bernier u. R. Lowy, 1959  
Nutritio et Dieta 1, 100
- Tucker, R. E., G. E. Mitchell u. C. O. Little, 1968  
J. Anim. Sci. 27, 824
- Virtanen, A. I., 1966  
Science N. Y. 153, 1603
- Walker, G. J. u. P. M. Hope, 1964  
Biochem. J. 90, 398
- Weller, R. A. u. F. V. Gray, 1954  
J. exp. Biol. 31, 40
- Wright, P. L., R. B. Grainger u. G. J. Marco, 1966  
J. Nutr. 89, 241

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. mult.  
J. Brüggemann danke ich für die Überlassung des  
Arbeitsplatzes im Institut für Tierphysiologie  
der Universität München.

Herrn Professor Dr. D. Giesecke gilt mein  
besonderer Dank für die Überlassung des Themas  
sowie seine wertvollen Hinweise, die zum Ge-  
lingen der Arbeit beitrugen.

Sehr herzlich danke ich Fräulein S. Wiesmayr  
für ihre stets freundliche Unterstützung.



## Lebenslauf

Am 27. 1. 1944 wurde ich in Freiburg/Breisgau als Sohn des Bildjournalisten Leif Geiges und seiner Ehefrau Marlies, geb. Wunn, geboren.

Vom Herbst 1950 bis Frühjahr 1954 besuchte ich die Volksschule in Bernau/Schwarzwald. Im Frühjahr 1963 legte ich am Kepler - Gymnasium in Freiburg meine Reifeprüfung ab.

Nach zweijähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr in Füssen immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1965 an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die Veterinärpraktikantenzeit absolvierte ich bei Herrn Dr. Hans Abmayr in Günzburg. Die tierärztliche Prüfung bestand ich am 3. Februar 1970, am 15. April 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Seit April 1972 bin ich als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten im Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels der Universität München tätig.









